



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Marcel Prelogović

Uloga vezivnih proteina i kutne difuzije u stvaranju svežnjeva mikrotubula

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of science

Marcel Prelogović

**Role of cross-linking proteins and
angular diffusion in the formation of
microtubule bundles**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2018.

SAŽETAK

Za vrijeme mitoze, mikrotubuli tvore diobeno vreteno čija je biološka uloga razdvajanje genetskog materijala. U stanicama kvasca diobeno vreteno ima oblik ravnog štapa kojeg sačinjavaju mikrotubuli koji rastu iz dva pola, a povezani su vezivnim proteinima. Mikrotubuli su organizirani u svežnjeve koji mogu biti paralelni, ako oba mikrotubula rastu iz istog pola, ili antiparalelni ako mikrotubuli rastu iz različitih polova, a naš cilj je razumijevanje dinamike nastanka ovakve strukture. Model uključuje kutno gibanje mikrotubula oko polova diobenog vretena pokretano termalnim silama i elastičnim silama koje proizvode vezivni proteini koji se mogu vezati za mikrotubule, odvezivati natrag u nukleoplazmu, te kad su vezani se mogu gibati duž mikrotubula. Rješenja modela pokazuju da mikrotubuli nasumičnim gibanjem pretražuju prostor, a kad dođu u blizinu svog para povezuju ih vezivni proteini koji efektivno proizvode kratkodosežne interakcije između mikrotubula. Paralelni svežnjevi mogu nastati djelovanjem pasivnih vezivnih proteina ili motora koji se kreću prema plus kraju mikrotubula, a za nastajanje antiparalelnih mikrotubula su potrebni motori koji se kreću prema minus kraju mikrotubula. Model predviđa očekivano vrijeme nastajanja svežnjeva, koje se slaže s eksperimentalnim podacima. Također, u slučaju antiparalelnog vezanja, model predviđa da se mikrotubuli koji dođu u kontakt gibaju jedan duž drugog brzinom motora, što je također potvrđeno i u eksperimentima. Zaključujemo da su glavni čimbenici u procesu nastajanja svežnjeva mikrotubula nasumično gibanje mikrotubula oko polova koje ima omogućava da dođu u kontak i kratkodosežne interakcije između njih uzrokovane vezivnim proteinima.

ABSTRACT

During mitosis, microtubules form a spindle, which is responsible for the segregation of chromosomes. In yeast cells, the spindle has a rod-like structure and is made of microtubules emanating from two poles connected by cross-linking proteins. Microtubules self-organize into parallel or antiparallel bundles, depending on whether they grow from the same or two different poles and our goal here is understanding how such structures form. Our model includes thermally driven angular pivoting of microtubules around the poles and elastic forces between them mediated by cross-linking proteins, which can detach to and detach from microtubules, as well as move along them. The solutions of our model imply that the random motion of the microtubules allows them to find a their pair, while the short-range interactions caused by the cross-linking proteins align them into bundles. Parallel bundling can occur in the presence of either passive crosslinkers or plus-end directed motors, while the formation of antiparallel bundles requires minus-end directed motors. The model predicts the average bundling time, which is in agreement with our experimental measurements. Additionally, for the case of antiparallel bundle formation, the model predicts that the velocity of the microtubules gliding along each other is the same as the velocity at which the motors move along the microtubules, and this was also confirmed experimentally. In conclusion, the main contributors to the formation of microtubule bundles are angular diffusion of microtubules around the poles allowing them to come into contact and short-range forces caused by cross-linking proteins that align them.

Extended abstract

Introduction. Cell division, a process in which one cell (the mother) splits into multiple cells (daughters) that carry copies of the mother's genetic material, is one of the most important processes occurring in all living beings. During mitosis, the genetic material is divided into two equal parts by the mitotic spindle. This complex, dynamic micro-machine is made of microtubules emanating from the spindle poles, chromosomes and a variety of accessory proteins. Microtubules are long, thin cytoskeletal polymers made of tubulin dimers, and they form the structural basis of the mitotic spindle. Depending on the cell, the mitotic spindle can be made of anywhere from tens to thousands of microtubules and needs to be efficiently and precisely reconstructed during each mitotic cycle. Microtubules extend from the spindle poles (centrosomes in most higher eukaryotes), and in most cells, microtubules extending from the same pole form parallel bundles in which all the microtubules move as one rigid filament. Some microtubule bundles extending from the spindle pole are bound to kinetochores on the chromosome, whereas others are bound to microtubules extending from the opposite pole, in an antiparallel configuration known as interpolar or overlap bundles. These complex configurations of microtubule bundles regulate the forces acting on chromosomes and spindle poles.

During spindle formation in a living cell, hundreds of microtubules grow out of spindle poles and align themselves in a very precise way, all on the scale of minutes. Because of this, the mitotic spindle is a great example of self-organization in nature and is of great interest, not just from the standpoint of biology, but from the standpoint of theoretical physics as well. Spindle self-organization has been observed in different biological systems and several theoretical models have been proposed. Because of the sheer complexity, most of the theoretical work consists of either large-scale simulations in which the movement and interactions of thousands of elements (microtubules and associated proteins) are simulated at once (Blackwell et al., 2017a; Nédélec, 2002) or more coarse-grained models that predict macroscopic properties and dynamics of the spindle, for example the liquid crystal model (Brugues i Needleman, 2014; Reber et al., 2013). While successful in modeling spindle formation in the particular species, the shapes, sizes, proteins involved and their dynamics vary significantly from cell type to cell type, meaning these approaches typically lack generality. A third alternative is, instead of modeling the entire process of spindle formation, to focus on a particular process important for spindle formation

in detail. A more microscopic approach is not only computationally less intensive, while still retaining all of the fine details, but also yields itself to using model organisms for experimental testing, because the dynamics investigated only depend on a small amount of components that have their analogues in a wide variety of cell types. An example of such an approach is the investigation of the kinetochore capture using the fission yeast as the model organism (Kalinina et al., 2013). Following the same approach, our goal in this work is to investigate the formation and stability of microtubule bundles, which are the main structural element of the mitotic spindle and for which, while there some in vitro studies, is no in vivo observations or a corresponding physical model.

Experimental observations of microtubule pivoting. In order to experimentally observe microtubule bundle formation, we use the fission yeast as our model organism. From our own measurements, as well from previous work, we know that the microtubules, which grow from spindle poles, perform thermally driven random angular motion. This angular motion is described with a Langevin equation for the unit vector pointing in the direction of the microtubule. Random pivoting is important for bundle formation because it allows the microtubules to search the space around the pole and find a pair they can form a bundle with. If two or more microtubules growing from the same pole form a parallel bundle, the entire bundle pivots around the pole, just like the individual microtubules do. The formation of parallel bundles is generally very fast and microtubules typically go from freely pivoting to parallel and moving together in a few seconds once they come into contact, but it can take minutes for them to find each other through random movement. If two microtubules or parallel bundles growing from opposite poles come into contact at an oblique angle, the formation of the antiparallel bundle is much slower than for parallel bundles. In this case, the microtubules typically spend tens of seconds sliding along each other, which we term the alignment phase. Our measurements show that during the alignment phase, microtubules move along each other at a constant velocity, which is the same for all observed bundles.

Modeling cross-linking proteins. Microtubules do not passively interact with each other, so they must be held together and aligned into bundles by specific proteins cross-linking the microtubules. Cross-linking proteins can be divided into three

classes: (i) motors that slide the microtubules and thus the spindle poles apart by walking along the microtubules away from the pole, i.e., towards the plus end of the microtubule, such as kinesin-5 motors; (ii) motors that pull the poles together by walking along the MTs towards the pole, i.e., towards the minus end of the MT, such as kinesin-14 motors; (iii) passive cross-linkers that connect microtubules without walking along them, such as Ase1 or PRC1. While motors can flip their directional bias in some cases, they are always characterized by requiring energy in form of ATP molecules to move. Because of the thermal fluctuations affecting the motors, their walking is stochastic in nature. On the other hand, passive cross-linkers do not use energy to move and therefore do not move in a preferred direction. However, they can still diffuse along microtubules, behaving like a Brownian particle in one dimension.

All types of cross-linkers can, aside from moving along the microtubules, attach to and detach from them. When each end of the cross-linker is attached to a different microtubule, the cross-linker behaves as a spring, exerting force on those microtubules. If one or both ends of the motor detaches, the cross-linker no longer affects the microtubules until it re-attaches. When talking about attached cross-linkers, we refer only to those that cross-link microtubules, i.e. have each end attached to a different microtubule. Attachment and detachment of cross-linkers is a random process, but it is affected by microtubule geometry. This is because the lengths of the microtubules are typically in microns, while the size of the cross-linkers is typically tens of nanometers, so the movement of cross-linked microtubules away from each other can cause the cross-linkers to break their bonds with the microtubule, significantly increasing the rate at which they detach. In a similar manner, if two microtubules are already far away from each other, it is impossible for cross-linkers to attach to them.

The probability of finding a cross-linking protein at any point along the microtubule, and hence their density in the mean-field approximation, can be described with a reaction-diffusion equation. The reaction part comes from their attachment and detachment, which we model as discrete Markov processes, and the diffusion refers to their stochastic movement along microtubules if they are attached. Once we calculate the distribution of cross-linking proteins along microtubules, we can sum up the contributions of all of them to the total torque experienced by the cross-linked microtubules. To calculate the force exerted on the microtubules, we

assume that each cross-linking protein connected to the microtubules behaves as an elastic spring.

Formation of parallel bundles. In the first of the two papers this work is based on (Prelogović et al., 2017), we focus on the dynamics of microtubules that grow from the same pole and form parallel bundles. Our experiments point to passive cross-linkers accumulating on the microtubules them, once they come into close contact through thermally driven pivoting, as the main cause of both the formation of parallel bundles and their maintenance. The main indication of this comes from the experiments on cells that lack Ase1 (a passive cross-linker known for its importance in yeast spindle formation) in which parallel bundles occurred significantly less often. Taking this into account, we constructed a minimal model in which one microtubule was fixed along the z-axis and the other was free to perform angular movement while one of its ends was fixed at the origin. Because of the symmetry around the z-axis, the only coordinate of interest for studying parallel bundle formation was the polar angle between the moving microtubule and the fixed one. The equation of motion for the polar angle is the Langevin equation in which the stochastic part represents thermal fluctuations, while the elastic forces exerted by passive cross-linkers cause the directed movement towards the z-axis. The passive cross-linkers were described in the mean-field approximation, so instead of their number and individual position, we only calculated their density along the microtubules. Their density was calculated from a reaction-diffusion equation, which included their diffusion along the microtubules, as well as their attachment and detachment. Because the movement of the microtubules is faster than the rearrangement of passive cross-linkers, we calculated their density in the steady state approximation to obtain an analytical expression. Integrating the torque weighted by the cross-linker density along both microtubules, we obtain the total torque exerted by the cross-linkers.

We show that near the origin, where the microtubules are closer to each other than is the relaxed length of the cross-linker, the cross-linkers overwhelmingly tend to arrange themselves so that they remain relaxed and do not exert elastic forces on the microtubules. However, at positions further towards the tip of the microtubule, the distance between microtubules becomes greater, and the cross-linkers that are attached there are stretched, exerting an attractive force between the microtubules. The smaller the polar angle between the microtubules becomes, the further towards

the tip the stretched cross-linkers are. This means that the torque exerted by the cross-linkers becomes greater, and at very small angles, it dominates over thermal fluctuations of the microtubules. The solutions of the equations confirm our intuition about the nature of the parallel bundle formation. At large angles between microtubules, they are too far apart for cross-linkers to attach, but if the polar angle, through random movement becomes small, even for a short time, the cross-linkers accumulate and connect the microtubules into a bundle. Simulating the sample paths of the polar angle obtained from our model shows that the equations, at least qualitatively, reproduced experimentally observed behavior.

Both in experiments and in theory, the microtubules exhibit two separate phases of behavior. They are either unbound, moving randomly and sweeping the entire space around the pole, or they only exhibit small fluctuations at very small angles, which represents the bound state. The transition between those states is very fast and in reality irreversible, but in experiments, any new microtubule starts in the unbound state. This allows us to compare the expected bundling times for microtubules in experiments with theoretical predictions. In order to calculate the average bundling time, we first calculated the effective interaction potential between microtubules caused by the cross-linkers. The potential has a deep well near zero and a critical angle at which the torques exerted by cross-linking proteins start dominating over thermal forces. Treating the microtubules as a two state system, and using the effective interaction potential, we can calculate macroscopic parameters for microtubule bundles, such as bundling probability and bundle stability. Most importantly, we can calculate how long, on average, it would take for a microtubule starting unbound at a random angle to become bound. We can also calculate the time it takes for the bound microtubule to become unbound. For realistic parameters, this time is much greater than the duration of cell division, which is expected because we do not observe unbundling in our experiments. Finally, we compared the average bundling time predicted by our model with observed values and found good agreement. We also measured the average bundling time in the mutants lacking Ase1, and extrapolating our data found that the deletion of this protein effectively reduces the available cross-linker concentration five-fold.

Finally, by changing how the cross-linked proteins move along the microtubules, we adapted our model describe microtubule dynamics when the forces between them are caused by active motors that use energy to move towards the

microtubule tips (plus-end) or the pole (minus-end). By performing the same kind of analysis we did for passive crosslinkers, we found that in the case of plus-end directed motors, the interactions between the microtubules are two orders of magnitude stronger than in the case of passive crosslinkers. This is because the motors that move towards the tips of the microtubules are always extended, so all of them contribute attractively. Because the interaction is very strong, it only takes a few attached motors to form stable bundles, and the interaction is attractive even for large angles between the microtubules. On the other hand, minus-end directed motors do not produce attractive torques at all because they tend to accumulate near the poles where the lever arm of their force vanishes. Therefore, even for large concentrations of minus-end directed motors, the microtubules just move randomly as though no motors were attached.

Formation of antiparallel bundles. Many of the assumptions we made and tested so far can be extrapolated to the case in which microtubules emanating from opposite poles meet and form an antiparallel bundle (Winters et al., 2019). The model now includes two microtubules, whose movement has to be parameterized with both the polar and the azimuthal angle for each microtubule because there is no longer any symmetry to exploit. In this work, we only describe the dynamics of microtubules in the presence of minus-end directed motors because the main suspect for orienting the microtubules into an antiparallel configuration in fission yeast is the kinesin Cut7. In our experiments, we observed the accumulation of Cut7 in the region where two microtubules emanating from opposite poles come into contact. Additionally, in experiments in which we inhibited Cut7, spindle formation, and therefore antiparallel bundling was significantly slower.

The model, again, includes thermal motion of microtubules around poles and elastic forces exerted by the motors. The motors were assumed to have a directional bias towards the poles, but their movement still had a stochastic component. In this case we could not simply use the reaction-diffusion equation for the density of the motors, because the motors now attach far away from the pole, and therefore attachment of individual motors causes significant changes in the torques the microtubules experience. To account this, we wrote the torque exerted by the motors as a function of their average position along the microtubules and the total number of attached motors. We included the additional noise caused by motor attachment and

detachment, which we approximated with an additional Gaussian white noise term contributing to the average position of the motors. We also wanted to test if antiparallel bundling can be mediated via passive cross-linkers, which we modeled analogously to the motors, except their movement along microtubules is considered purely diffusive, with no directional bias.

In this case, formation of bundles has a transitional phase between unbound and bound states, which we termed the alignment phase. This phase is seen in both experiments and simulations of our model, and allows us to make predictions about the mesoscopic scale of the system, and not just its macroscopic properties. Microtubules in the alignment phase exhibit linear movement along each other, so it is quantified by the length of the contour running from one pole to the point of contact and then to the other pole. The rate at which this length changes is termed contour velocity. The contour velocity does not significantly vary between the observed bundles, and its value is close to the velocity of the kinesin motors, indicating that the microtubules are sliding along each other at the same speed as the motors that carry it. Our model indicates that this picture is correct: contour velocity always corresponds to the motor velocity. On the other hand, passive cross-linkers, which do not have a natural velocity can not reproduce the observed linear contour dynamics and can not lead to microtubule alignment into an antiparallel bundle on realistic time scales.

On macroscopic time scales, formation of antiparallel bundles is again quantified by the average bundling time. In this case, the velocity of the motors has little effect on the result, because alignment occurs on scales of seconds, while the entire process of spindle formation takes minutes. Average bundling time depends on how long it takes for unbound microtubules to find each other, and therefore the main contributor to spindle formation time is the diffusion constant of the microtubules. Because the diffusion constant depends heavily on the length of the microtubules, we measured the spindle formation times in experiments as a function of the spindle length. The average bundling time calculated from our model accurately reproduces the spindle formation time in experiments, yielding additional credence to our model.

Conclusion. Our theory, supported by our experimental observations, indicates thermal angular motion of microtubules around poles coupled with close-range interactions mediated by cross-linking proteins constitute the main mechanism of microtubule bundle formation. Depending on whether the two microtubules grow

from the same or from the opposite poles, they can form parallel or antiparallel bundles, respectively. While the forces exerted by cross-linking proteins can align microtubules and hold them together, the random angular motion of the microtubules allows them to search for their pair and get close enough to each other that the distances are comparable to the size of the cross-linking proteins. Once the microtubules are close to each other, the cross-linking proteins accumulate and align the microtubules into bundles. The main difference between parallel and antiparallel bundle formation is that antiparallel bundling requires minus-end directed motors, which align microtubules by moving one microtubule along the other. On the other hand, parallel bundling can be mediated by passive cross-linkers alone, as well as plus-end directed motors.

In the case of parallel bundle formation, our model implies that random diffusion, attachment and detachment of cross-linking proteins are enough to align microtubules into a parallel bundle, though active movement of cross-linking proteins towards the microtubule tips would greatly increase bundle stability. Our model predicts the macroscopic properties of the bundling process for parallel bundles, such as bundle stability and bundling time. Experimental measurements in fission yeast show that the average bundling time depends primarily on the microtubule length, due to the fact that shorter microtubules have a greater angular diffusion coefficient. The bundling time normalized by the diffusion coefficient increases with microtubule length and the concentration of cross-linkers in the nucleoplasm. We measured the normalized bundling time, both in unperturbed cells, and in the cells lacking Ase1, a passive cross-linker important for spindle formation in yeast, and the observations agree with the predictions of the model.

For microtubules growing from opposite poles, both the model and the experiments show that the process acts on two distinct time scales. The macroscopic time scale (on the order of minutes) is, just like for parallel bundles, dominated by microtubule diffusion as they search for each other. Once the microtubules come into contact, the motors slide the microtubules along each other, aligning them into an antiparallel configuration. Microtubule alignment occurs on the mesoscopic time scale (on the order of seconds), and governed by the properties of the motors. The macroscopic behavior in our model is quantified by the average bundling time, and we compared it with the average spindle formation time in experiments. Our model predicts that the spindle formation time increases with microtubule length and

decreases with the number of microtubules involved, showing good agreement with the experiments. We also quantified the behavior on the mesoscopic time scale by measuring how the contour length changes in time, and our model predicts that the velocity of microtubules sliding along each other is constant, and close to the velocity of the motors. This prediction is confirmed by experimental measurements of the contour length, showing that our model accurately describes parallel bundling on both the macroscopic and the mesoscopic scale.

1	UVOD	17
1.1	ELEMENTI I MEHANIZMI NASTAJANJA DIOBENOG VRETENA	17
1.1.1	STANIČNA DIOBA I DIOBENO VRETENO	17
1.1.2	MIKROTUBULI I NJIHOVI SVEŽNJEVI	20
1.1.3	VEZIVNI I MOTORNI PROTEINI	22
1.1.4	MODELI NASTAJANJA DIOBENOG VRETENA	24
1.1.5	MODELNI ORGANIZAM: KVASAC SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE	26
1.2	STOHAISTIČKI PROCESI U BIOFIZICI	27
1.2.1	NASUMIČNE VARIJABLE I STOHAISTIČKI PROCESI	27
1.2.2	MARKOVLJEVO SVOJSTVO I MARKOVLJEVI LANCI	28
1.2.3	KONTINUIRANO VRIJEME I MASTER JEDNADŽBA	30
1.2.4	POISSONOV PROCES	31
1.2.5	KONTINUIRANI PROSTOR STANJA	33
1.2.6	DIFUZIJSKI PROCES I WIENEROV PROCES	34
1.2.7	REAKCIJSKO-DIFUZIJSKA JEDNADŽBA	38
1.2.8	BROWNOVO GIBANJE U FIZICI I LANGEVINOVA JEDNADŽBA	40
1.2.9	SPECIJALNI SLUČAJEVI, STACIONARNO RJEŠENJE I POOPĆENJE NA VIŠE DIMENZIJA	46
1.2.10	MULTIPLIKATIVNI ŠUM, ITO I STRATONOVICH INTERPRETACIJA	47
2	REZULTATI	51
2.1	FORMIRANJE DIOBENOG VRETENA OPAŽENO SVJETLOSIM MIKROSKOPOM	51
2.1.1	EKSPERIMENTALNI POSTAV	51
2.1.2	NASTAJANJE PARALELNIH SVEŽNJEVA	52
2.1.3	NASTAJANJE ANTIPARALELNIH SVEŽNJEVA I AKUMULACIJA MOLEKULARNIH MOTORA	54
2.1.4	PERTURBACIJE EKSPRESIJE MOTORNIH I VEZIVNIH PROTEINA	55
2.1.5	NASUMIČNO KUTNO GIBANJE MIKROTUBULA	56
2.2	MODELIRANJE MIKROTUBULA I VEZIVNIH PROTEINA	57
2.2.1	PIVOTIRANJE MIKROTUBULA OKO POLOVA	57
2.2.2	MODELIRANJE SILA KOJIMA DJELUJU VEZIVNI PROTEINI	60
2.2.3	VEZANJE I ODVEZIVANJE VEZIVNIH PROTEINA	61
2.2.4	VRIJEDNOSTI KONSTANTNIH PARAMETARA	64
2.3	NASTAJANJE PARALELNIH SVEŽNJEVA	67
2.3.1	TEORIJSKI MODEL ZA ORIJENTACIJE MIKROTUBULA	67
2.3.2	GUSTOĆA PASIVNIH VEZIVNIH PROTEINA I MOMENT SILE KOJI ONI STVARAJU	71
2.3.3	PUTANJE MIKROTUBULA I POTENCIJAL INTERAKCIJE	75
2.3.4	STABILNOST I PROSJEČNO VRIJEME NASTAJANJA SVEŽNJEVA	80

2.3.5	USPOREDBA TERORIJSKIH PREDVIĐANJA S EKSPERIMENTALNIM MERENJIMA	83
2.3.6	GUSTOĆA MOTORA I MOMENT SILE KOJI ONI STVARAJU	85
2.4	NASTAJANJE ANTIPARALELNIH SVEŽNJEVA	89
2.4.1	GEOMETRIJA S DVA MIKROTUBULA	89
2.4.2	DINAMIKA MOLEKULARNIH MOTORA	91
2.4.3	RJEŠENJA MODELA	93
2.4.4	RJEŠAVANJE MODELA I PREDVIĐANJA NA MEZOSKOPSKOJ SKALI	100
2.4.5	PREDVIĐANJA MODELA NA MAKROSKOPSKOJ SKALI	103
3	ZAKLJUČAK I DISKUSIJA	104
4	REFERENCE	108
5	ŽIVOTOPIS I POPIS RADOVA	115

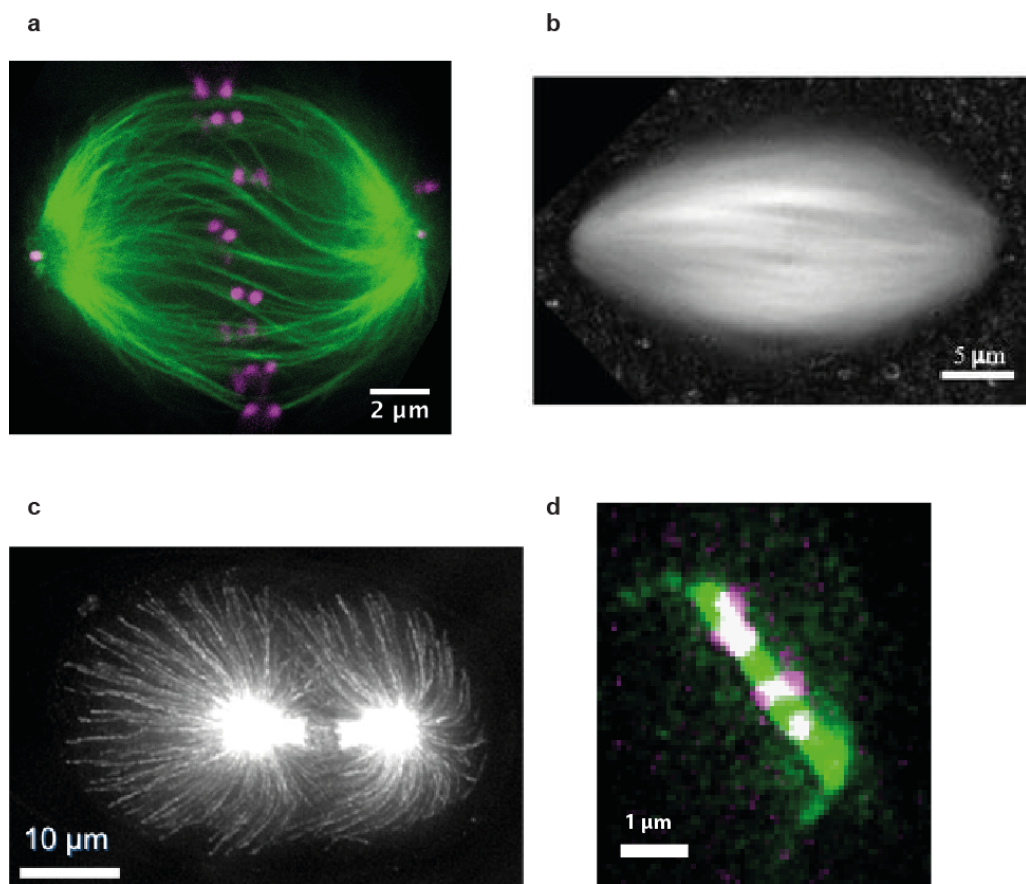
1 Uvod

U ovom radu proučavano je nastajanje svežnjeva mikrotubula. Svežnjevi mikrotubula su važan strukturni element diobenog vretena, tako da bi ovdje prikazani rezultati trebali poboljšati naše razumijevanje ovog neophodnog elementa svake eukariotske stanice. U prvom poglavlju pobliže je opisana struktura diobenog vretena, njegovi glavni sastavni elementi – mikrotubuli i vezivni proteini, te opisani neki do sada objavljeni radovi koji opisuju nastanak diobenog vretena iz perspektive biofizike. Za danje čitanje o diobenom vretenu preporuča se (Alberts et al.), a o mikrotubulima i vezivnim proteinima (Howard, 2001). Također je uveden matematički formalizam potreban za razumijevanje teorijskih rezultata opisanih u kasnijim poglavljima, što uključuje teoriju vremenski kontinuiranih Markovljevih procesa i stohastičkih diferencijalnih jednažbi. Način na koji su glavni matematički pojmovi uvedeni uglavnom prati (Gardiner, 1985), a veza sa statističkom fizikom i biofizikom dana je po uzoru na (Van Kampen, 1992). Dodatna literatura od interesa je (Hsu, 2002; Øksendal, 2003). U drugom poglavlju opisana su eksperimentalna mjerenja koja motiviraju našu teoriju i koja kasnije uspoređujemo s našim predviđanjima, te su zatim dani modeli nastajanja paralelnih i antiparalelnih svežnjeva, te njihovi rezultati. Ovdje opisani eksperimenti objavljeni su u (Prelogović et al., 2017; Winters et al., 2019). Konačno, u trećem poglavlju je dan zaključak, kao i šira slika i prijedlozi budućih znanstvenih radova.

1.1 *Elementi i mehanizmi nastajanja diobenog vretena*

1.1.1 *Stanična dioba i diobeno vreteno*

Samoreplikacija predstavlja jedan od osnovnih fenomena koji razlikuju živu od nežive tvari. Kako bi se genetski materijal iz stanice majke ispravno rasporedio između stanica kćeri, eukariotske stanice za vrijeme diobe formiraju diobeno vreteno. Diobeno vreteno je organizirana mreža proteinskih filamenata, mikrotubula, koji se protežu iz dva pola, međusobno se isprepliću, te su povezani s kromosomima koji sadrže genetski materijal i sastoje se od dvije sestrinske kromatide (Pavin i Tolic, 2016). Primjer mitotičkog diobenog vretena u ljudskoj stanici dan je na slici 1.1a. Nakon što su svi kromosomi ispravno vezani za diobeno vreteno, polovi se razdvajaju, te za sobom vuku svaki po jednu kromatidu.



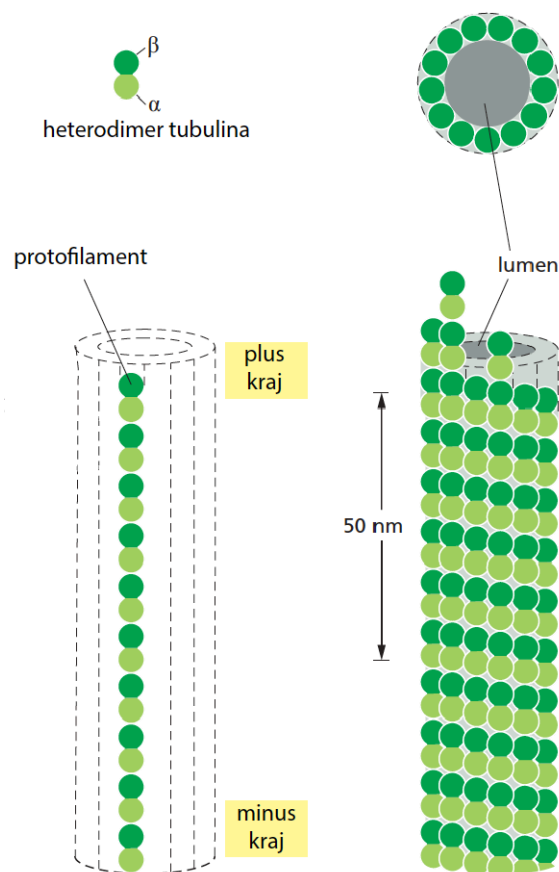
Slika 1.1. Mitotička vretena u različitim stanicama. **(a)** Ljudska HeLa stanica, zelenom bojom su označeni mikrotubuli, a ljubičastom kinetohore (snimljeno u Tolić Lab, IRB) **(b)** Ekstrakt jajašca *X. laevis*, bijelo su označeni mikrotubuli. Preuzeto i prilagođeno iz (Brugues i Needleman, 2014). **(c)** Embrij *C. elegans*, bijelo su označeni mikrotubuli. Preuzeto i prilagođeno iz (White, 1977). **(d)** Kvasac *S. pombe*, zelenom bojom su označeni mikrotubuli, a ljubičastom kinetohore (snimljeno u Tolić lab, IRB).

Nakon svake diobe, mitotičko vreteno se raspadne, te prije nove diobe ponovno sastavi, pa mehanizmi njegovog formiranja moraju biti energetski i vremenski efikasni. S druge strane, za opstanak nove generacije stanica je važno da odvajanje kromatida bude precizno, pa formiranje diobenog vretena mora biti vrlo reproducibilno. Neprecizno ili neefikasno dijeljenje genetskog materijala ima katastrofične efekte na opstanak bilo koje vrste, pa je mehanizam nastanka i djelovanja diobenog vretena pod velikim selekcijskim pritiskom. Različiti organizmi koji žive u različitim uvjetima su morali razviti različite načine da postignu balans između ova dva principa, a rezultat toga su velike razlike u veličini, građi i mehanizmima unutar diobenog vretena od vrste do vrste. Veličina diobenog vretena se uglavnom skalira linearno s veličinom stanice (veličine stanica su uglavnom

10 – 100 μm), tako da diobena vretena mogu imati duljinu od nekoliko mikrona u kvascima pa sve do više desetaka mikrona u biljnim stanicama (Crowder et al., 2015). Građa i geometrija diobenog vretena također variraju među organizmima. Mitotičko vreteno tipično zamišljamo kao izduženi elipsoid s dugim mikrotubulima koji se protežu duž velike poluosi, s kromosomima koji svojom sredinom vezani na krajeve mikrotubula oko ekvatora vretena (slika 1.1a). Ovakva slika dobro opisuje geometriju i građu diobenog vretena sisavaca (Pavin i Tolic, 2016), ali kako bismo ilustrirali raspon varijacija, navest ćemo nekoliko primjera koji značajno odstupaju od ovakve slike. Za razliku od relativno rigidne strukture vretena sastavljenog od dugih svežnjeva mikrotubula, u ekstraktu embrija žabe *Xenopus laevis* opažamo diobeno vreteno koje se sastoji od mnoštva kratkih mikrotubula koji su međusobno slabo vezani, nalik na tekući kristal (Slika 1.1b) (Brugues i Needleman, 2014). Zatim, nematoda *Caenorhabditis elegans* je primjer organizma koji ima holocentrično diobeno vreteno (White, 1977). Za razliku od monocentričnog vretena u npr. sisavcima, holocentrično vreteno ima kinetohore, male proteinske komplekse koji vežu mikrotubule i kromosome, raspodijeljene duž cijelih kromatida, a ne samo u sredini gdje su one i međusobno povezane (slika 1.1c). Konačno, stanice kvasaca, kao što je *Schizosaccharomyces pombe*, nemaju tipičnu elipsoidnu, nego skoro jedno-dimenzionalnu geometriju, a sastoje se od jednog svežnja mikrotubula na čijoj su sredini kromosomi poslagani u liniju (slika 1.1d), a za razliku od stanica sisavaca, ne gube jezgrinu ovojnicu tijekom diobe (Ding et al., 1993; McCully i Robinow, 1971). Ove razlike otežavaju razvijanje općenite teorije nastanka diobenog vretena. Međutim, postoje i svojstva koja su očuvana kroz mitotička vretena skoro svih eukariota. Zbog toga što pri završetku diobe svaka kromatida mora završiti u svojoj stanici kćeri, diobeno ima izduženu geometriju s dobro definiranom osi duž koje se kromosomi razdvajaju (Kirschner i Mitchison, 1986). Većina mitotičkih vretena, uz iznimku biljnih, imaju na polovima proteinske komplekse kao što su centrosomi. Što se tiče sastava, osnovni građevni elementi svih mitotičkih vretena su mikrotubuli (Kirschner i Mitchison, 1986). S obzirom da se mikrotubuli međusobno ne privlače izravnim interakcijama, stabilnost mitotičkog vretena osiguravaju vezivni proteini (engl. *cross-linking proteins* ili samo *crosslinkers*) (Pavin i Tolic, 2016; Prosser i Pelletier, 2017). U narednim poglavljima ćemo pobliže opisati ove sastavne elemente.

1.1.2 Mikrotubuli i njihovi svežnjevi

Mikrotubuli su dio staničnog kostura (citoskeleta), koji se osim njih sastoji i od aktinskih filamenata i intermedijalnih vlakana. S obzirom da ostali elementi citoskeleta ne sudjeluju u izgradnji mitotičkog vretena, mi ćemo se fokusirati na mikrotubule. To su polimeri proteina tubulina koji je heterodimer, odnosno sastoji se od globularnih proteina α -tubulina i β -tubulina koji su snažno vezani nekovalentnim vezama. Mikrotubuli su šuplje cilindrične strukture (poput šupljih cjevčica) koju čine 13 paralelnih protofilamenata (slila 1.1). Protofilamente čine $\alpha\beta$ -tubulin heterodimeri poredani naizmjenično jedan za drugim u kolonu. S obzirom da je svaka podjedinica protofilamenta usmjerena u istom smjeru, a protofilamenti su međusobno paralelni, onda i mikrotubuli imaju strukturnu i dinamičku polarnost. Kraj mikrotubula na kojem se nalazi β -tubulin zove se minus kraj dok se onaj na kojem se nalazi α -tubulin zove plus kraj mikrotubula (treba imati na umu da se ovdje plus i minus ne odnose na naboje, tubulin u živoj stanici ne ostvaruje značajne elektrostatske interakcije). Mikrotubuli nisu statične strukture, nego naizmjenice rastu i skraćuju se, a to svojstvo nazivamo dinamička nestabilnost (Kirschner i Mitchison, 1986). Plus kraj mikrotubula ima jaču dinamiku, odnosno brže raste i brže se skraćuje. Dinamička svojstva mikrotubula omogućuje kemijska energija molekula GTPa, a dimeri tubulina mogu vezati dvije molekule GTP-a. Hidroliza GTP-a odvija se samo na podjedinici β -tubulina. Ukoliko podjedinice tubulina dolaze na plus kraj prije nego se desi hidroliza GTP na tom kraju imat ćemo polimerizaciju, odnosno rast mikrotubula. No, ukoliko je stopa spajanja podjedinica na plus kraj mikrotubula manja, te se u podjedinicama tubulina koje su se prethodno spojile na mikrotubul već dogodila hidroliza GTP-a u GDP, mikrotubul će se početi skraćivati. Promjena iz rasta mikrotubula u skraćivanje zove se katastrofa (engl. *catastrophe*), dok se ponovna promjena u rast zove spas (engl. *rescue*) (Howard, 2001). Osim filamenata tubilinskih dimera, mikrotubuli se sastoje i od γ -tubulina. On se nalazi na minus kraju mikrotubula i omogućava njihovo vezanje za podlogu ili čak drugi mikrotubul (Goshima et al., 2008; Mahoney et al., 2006; Murata et al., 2005).

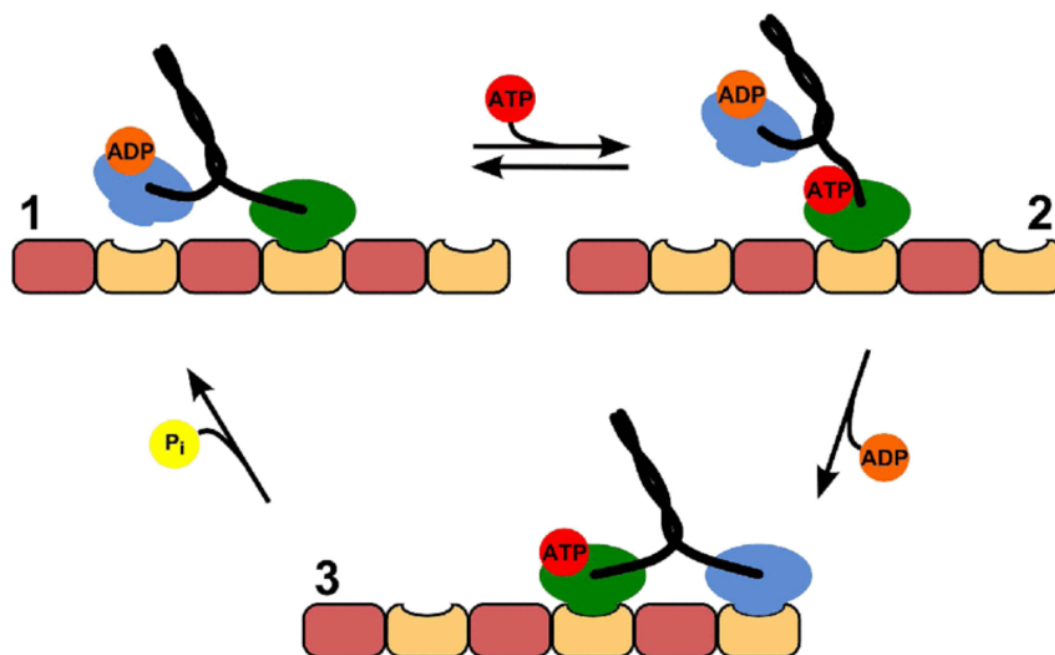


Slika 1.2. Shematski prikaz tubulina i mikrotubula. Heterodimeri tubulina (gore lijevo) u lanac i čine protofilament (dolje lijevo). Više protofilamenata (najčešće 13) se poredaju lateralno (gore desno), te tako formiraju mikrotubul. Preuzeto i prilagođeno iz (Alberts et al.).

U stanicama se više mikrotubula može organizirati u veće strukture, ovisno o tipu stanice i funkciji koju trebaju obavljati. U diobenom vretenu, mikrotubuli se organiziraju u svežnjeve, koji se najčešće protežu iz dva pola diobenog vretena (Kirschner i Mitchison, 1986; Mastronarde et al., 1993a; McDonald et al., 1992). Ukoliko mikrotubuli rastu u istom smjeru formiraju strukture paralelnih mikrotubula, koje nazivamo paralelni svežnjevi (Ding et al., 1993). Ako mikrotubuli, ili već formirani paralelni svežnjevi, mikrotubula rastu iz različitih polova jedan prema drugom, odnosno protežu se u suprotnim smjerovima, tada formiraju strukture koje nazivamo antiparalelni svežnjevi (Brinkley i Cartwright, 1971; Ding et al., 1993; Mastronarde et al., 1993b; Winey et al., 1995). Antiparalelni svežnjevi se u diobenom vretenu često nazivaju interpolarna vlakna, a njihova glavna funkcija je regulacija sila na kromosome i polove što omogućava razdvajanje kromosoma (Cande i McDonald, 1985; Kajtez et al., 2016; Novak et al., 2017; Polak et al., 2017; Saunders et al., 1997; Sharp et al., 1999; Vukusic et al., 2017).

1.1.3 Vezivni i motorni proteini

Vezu između mikrotubula ostvaruju proteini koji se mogu odjednom vezati na barem dva mikrotubula. Mogu se razlikovati po načinu na koji se kreću duž mikrotubul: (i) difuzivno, odnosno pasivno, npr. Ase1/PRC1 (Hagen i Yanagida, 1990; Le Guellec et al., 1991) te (ii) usmjereno uz potrošnju energije dobivene hidrolizom ATPa (Howard, 2001) prema minus kraju, npr. Cut7/EG5 (Hagen i Yanagida, 1990; Le Guellec et al., 1991) ili prema plus kraju, npr. Ncd (Endow et al., 1990; McDonald et al., 1990). Vezivne proteine koji se gibaju aktivno zovemo motorni proteini ili samo motori. Motorni proteini zaslužni su za prenošenje organela na odgovarajuća mjesta u stanici. Također, motorni proteini mogu uzrokovati klizanje filamenata jedan u odnosu na drugi te tako generirati sile koje uzrokuju, npr., kontrakciju mišića i diobu stanica. Kao i u slučaju diobenog vretena, vezivni proteini i motori se pojavljuju kao neophodni sastavni dio u svim živim stanicama, pa ne samo da ih ima mnogo različitih vrsta u pojedinoj stanici, nego se vezivni proteini koji obavljaju slične funkcije razlikuju u strukturi od vrste do vrste (Vale, 2003).



Slika 1.3. Shematski prikaz “koračanja” motornog proteina kinezina po mikrotubulu. (1→2) Vezanje ATP-a na glavu koja se nalazi na mikrotubulu (zeleno) mijenja konformaciju motora, te pomiče njegovo težište naprijed. (2→3) Slobodna glava (plavo) se preferencijalno veže na mikrotubul s prednje strane ispred vezane glave. (3→1) Hidrolizom ATP-a u ADP stražnja glava gubi afinitet za mikrotubul, te postaje slobodna. Preuzeto iz (Sozanski et al., 2015).

Na slici 1.3 prikazan je shematski prikaz “koraćanja” motora po mikrotubulu na primjeru kinezina. Prednja glava motora je čvrsto vezana za mikrotubul, dok je stražnja slobodno difundira jer se na njoj nalazi ADP koji smanjuje afinitet prema mikrotubulu. Iako je gibanje stražnje glave nasumično, vjerojatnost vezanja ispred i iza učvršćene glave nije ista, jer se energija sadržana u molekuli ATP-a koristi za promjenu konformacije cijelog motora, tako da se centar mase cijelog motora pomiče unaprijed. Uklanjanjem molekule ADP-a sa stražnje glave povećava se njen afinitet prema mikrotubulu, te ona ostaje vezana za mikrotubul. Hidrolizom se ATP na stražnjoj glavi pretvara u ADP uz oslobađanje fosfata, konformacija motora se vraća na početnu, te cijeli proces kreće iz početka. Kinezin se veže na mjesta na filamentu gdje se sastaju dvije molekule tubulina (Hancock i Howard, 1998; Svoboda i Block, 1994), tako da koraci koje pomična glava napravi po molekuli ATPa iznose 16 nm. S obzirom da druga glava ostaje na mjestu, centar mase motora se pomiče za 8 nm po molekuli ATPa (Coy et al., 1999).

Iako su koraci mali, ovdje opisani mehanizam koordiniranog otkvaćivanja samo jedne glave omogućava motoru da prođe nekoliko stotina nanometara bez da se u potpunosti odvoji od mikrotubula, čak i kad teret proizvodi jaku silu na njega, a to svojstvo se naziva procesivnost (Gennerich et al., 2007; Gennerich i Vale, 2009; Taylor i Borisy, 2000; Valentine i Gilbert, 2007). U slučaju kad je motor pod opterećenjem, potrebno je više energije kako bi se on pomaknuo, tako da je gibanje motora sporije. Ovisnost sile opterećenja i prosječne brzine gibanja motora je linearna (Meyhöfer i Howard, 1995; Svoboda i Block, 1994), a teorijski model koji opisuje kako opterećenje utječe na mehanizam koraćanja i mijenja ukupnu brzinu motora dan je u (Kolomeisky i Fisher, 2007).

Pasivni vezivni proteini se također mogu gibati po filamentima. To pomcanje je, kao i kod motora, uzrokovano nasumičnim otkvaćivanjem njegovih glava. Međutim, u tom procesu ne sudjeluje ATP i ne mijenja se konformacija tijekom koraćanja, pa je njima vjerojatnost pomaka u jednu i drugu stranu jednaka, a njihovo gibanje opisujemo kao 1D Brownovo gibanje. Iako difuzivno gibanje nema preferirani smjer, u slučaju kad oni povezuju dva mikrotubula, koji imaju konačne duljine, mogu stvoriti entropijske sile na sličan način kao idealni plin u zatvorenoj posudi (Lansky et al., 2015). Entropijske sile su rezultat interakcija na krajevima mikrotubula, koji predstavljaju jedina mjesta gdje se slama simetrija u vjerojatnostima pomaka u jednu i drugu stranu. Entropijske sile su razlog zašto pasivni vezivni

proteini imaju važnu ulogu u stabilizaciji antiparalelnih preklopa mikrotubula. Zamislimo antiparalelni preklap mikrotubula kao 1D zatvoreni sustav, u kojem plus krajevi mikrotubula predstavljaju rub, tada se oba kraja svakog vezivnog proteina mogu nasumično pomaknuti za duljinu jedne molekule tubulina, i to s jednakom vjerojatnošću prema svakom susjednom tubulinu. Svaki pomak vezivnog proteina duž jednog mikrotubula stvara malu silu na drugi mikrotubul. Bilo gdje osim na plus kraju mikrotubula, svaki pomak prema plus kraju jednako je vjerojatan kao i pomak prema minus kraju, pa ukupna sila mnoštva vezivnih proteina iščezava. Međutim, na plus krajevima mikrotubula su mogući samo pomaci prema minus kraju, tako da nasumično gibanje vezivnih proteina koji se nađu na plus kraju stvaraju efektivnu silu koja pomiče plus kraj jednog mikrotubula prema minus kraju drugog, povećavajući preklap. Što je preklap manji, to je veći udio vezivnih proteina koji se nalaze na plus krajevima mikrotubula, te je sila koja povećava preklap veća. Koristeći analogiju s idealnim plinom, “sudari” pasivnih vezivnih proteina s vrhom mikrotubula stvaraju “tlak” koji djeluje tako da pomakne taj vrh, odnosno poveća dostupni prostor. Ovakav model entropijskih sila pasivnih vezivnih proteina (Johann et al., 2015) uspješno predviđa rezultate in vitro eksperimenata na antiparalelnim parovima mikrotubula u kojima se pasivni vezivni proteini suprotstallaju motorima koji koračaju prema plus kraju mikrotubula i djeluju tako da razdvoje mikrotubule (Lansky et al., 2015).

1.1.4 Modeli nastajanja diobenog vretena

Već smo spomenuli da se mitotičko vreteno sastavlja kad se stanica počne dijeliti, te zatim raspada nakon diobe. Tipično, od nastanka mitotičkog vretena do kraja diobe prođe do jednog sata (Alberts et al.). Za vrijeme diobe, mitotičko vreteno se ponaša kao mikro-stroj: veže na sebe kromosome, poravnava ih, te zatim ih razdvaja, a svaka od tih radnji zahtjeva da vreteno prođe značajne konformacijske promjene. Unatoč kompleksnosti njegove funkcije i kratkog vremena formacije, mitotičko vreteno je u potpunosti samo-sastavljeno, bez pomoći drugih organela u stanici. Zbog toga je to jedan od najzanimljivijih primjera samo-organizacije u prirodi (Pavin i Tolic, 2016).

S obzirom da su svežnjevi mikrotubula zajednički sastavni element svih mitotičkih vretena, teorijski modeli koji opisuju strukturu i formaciju mitotičkog vretena su uglavnom fokusirani na opisivanje dinamike mikrotubula. Ovisno o vrsti stanice, do sada je predloženo nekoliko teorijskih modela koji opisuju formaciju

diobenog vretena. U nastavku ćemo dati pregled nekih od takvih modela. U (Nedelec, 2002), numeričkim simulacijama je proučavan nastanak antiparalelnih svežnjeva u somatskim stanicama viših eukariota, a uz to je u više radova proučavana i regulacija duljine njihovog preklopa (Braun et al., 2011; Johann et al., 2015; Lansky et al., 2015). Iako istraživanja na stanicama viših eukariota, gdje spadaju i ljudi, imaju najširu primjenu, te stanice nisu uvijek pogodne zbog komplicirane građe i velikog genoma što otežava perturbacije. Zbog toga se često fundamentalni principi istražuju na modelnim organizmima. Modeli mitotičkog vretena u embrijima mušice *Drosophila melanogaster* uključuju molekularne motore koji djeluju na antiparalelnim preklapima mikrotubula, te dinamiku samih mikrotubula, čime se proizvode sile koje razdvajaju polove za vrijeme mitoze (Cytrynbaum et al., 2003; Cytrynbaum et al., 2005; Wollman et al., 2008). U modelu koji opisuje formaciju mitotičkog vretena u ekstraktu jajašaca žabe *Xenopus Laevis*, mikrotubuli se nukleiraju blizu kromosoma, a zatim transportiraju prema polovima i grupiraju, zbog čega se ovakav model naziva klizanje i grupiranje (engl. slide and cluster) (Burbank et al., 2007; Loughlin et al., 2010). Zbog toga što se radi o mnoštvu relativno malih svežnjeva mikrotubula koji su pokretni, a na lokalnoj razini je njihov protok reguliran kratkodosežnim interakcijama koje proizvode vezivni proteini te steričkim interakcijama, za opisivanje ovog sustava je pogodno koristiti teoriju tekućih kristala (Brugues i Needleman, 2014; Reber et al., 2013). U pivskom kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, predložen je model u kojem mikrotubuli koji rastu iz polova pod nasumičnim kutovima mijenjaju smjer i poravnavaju se u antiparalelne svežnjeve zbog djelovanja molekularnih motora kinezin-14 (Hepperla et al., 2014). U isto vrijeme, ispravno pozicioniranje mitotičkog vretena u stanici osiguravaju motori miozini koji se kreću po aktinskim vlaknima i omogućavaju astralnim mikrotubulima (mikrotubulima koji nisu spojeni u tijelo vretena nego rastu u nasumičnim smjerovima) da pronađu mjesta na korteksu gdje se mogu učvrstiti (Baumgartner i Tolic, 2014). U kvascu *Schizosaccharomyces pombe*, pokazano je da termalne fluktuacije mikrotubula (Cojoc et al., 2016; Kalinina et al., 2013; Pavin i Tolic-Norrelykke, 2014), kao i njihova dinamička nestabilnost (Blackwell et al., 2017b) omogućavaju efikasno hvatanje kinetohora, a time i kromosoma. U suvremenim radovima je numerički simulirano nastajanje cijelog diobenog vretena, a ti modeli uključuju dinamičku nestabilnost, pomicanje polova diobenog vretena po staničnoj ovojnici, te interakciju između mikrotubula zbog djelovanja pasivnih vezivnih

proteina i aktivnih molekularnih motora (Blackwell et al., 2017a; Blackwell et al., 2017b; Lamson et al., 2019). Unatoč mnoštvu objavljenih radova koji opisuju formaciju diobenog vretena, uglavnom se radi o modelima reproduciraju ponašanje tog sustava na velikim prostornim i vremenskim skalama. Ono što nedostaje je opažanje dinamike procesa nastajanja pojedinačnih svežnjeva mikrotubula u živoj stanici i odgovarajući teorijski model.

1.1.5 Modelni organizam: kvasac *Schizosaccharomyces pombe*

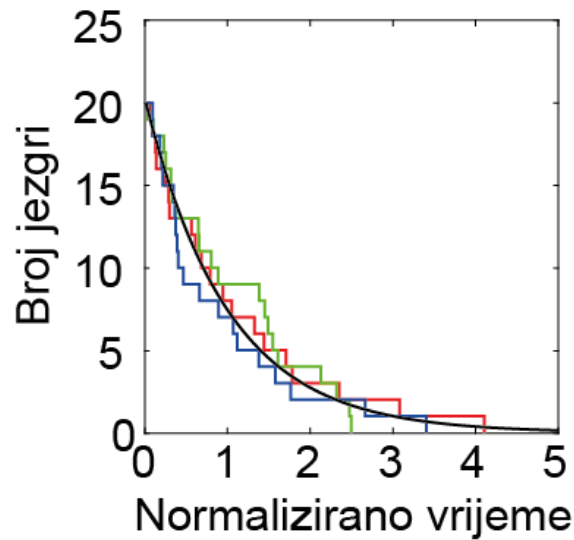
Naš konačni cilj je bolje razumijevanje procesa koji dovode do formiranja diobenog vretena, kao što je nastajanje svežnjeva mikrotubula. Kako bismo naš model mogli usporediti s eksperimentalnim opažanjima nastajanja diobenog vretena, trebamo taj proces snimiti u živoj stanici. U stanicama viših eukariota, opažanje interakcija između pojedinačnih mikrotubula nije moguće današnjim eksperimentalnim postupcima zbog velike količine mikrotubula koji se međusobno isprepliću i tvore svežnjeve (Yamashita et al., 2015). Zbog toga za modelni organizam koristimo kvasac *S. Pombe*. Ovaj kvasac se proučava još od 1950., a interes za njega je počeo u području genetike (Leupold, 1950), zbog toga što ima relativno mali broj gena i samo tri kromosoma. Do danas je njegov genom u potpunosti sekvencioniran, što znatno olakšava perturbacije ekspresije gena u mikrobiološkim istraživanjima. Dodatne prednosti kvasca *S. pombe* je da se radi o relativno velikoj stanici (za mikroorganizam), te ga je lako uzgojiti (Mitchison, 1990). S obzirom da nas zanimaju mehanizmi nastanka diobenog vretena, i iako su do sada navedena svojstva i te kako korisna, glavni razlog zbog kojeg smo se odlučili za *S. pombe* je činjenica da njegovo diobeno vreteno ima vrlo jednostavnu, linearnu strukturu (slika 1.1d) koja se sastoji od jednog velikog svežnja mikrotubula, što je potvrđeno i elektronskom mikroskopijom (Ding et al., 1993; Grishchuk i McIntosh, 2006). Ovakva struktura diobenog vretena idealna je za proučavanje nastajanja svežnjeva, a jedina prepreka u korištenju ovog organizma za naša istraživanja je i dalje relativno mala veličina diobenog vretena (tipično oko 3 μm u metafazi, razlučivost konfokalnog mikroskopa je oko 200 nm) i činjenica da se većina svežnjeva formira dok su polovi jako blizu jedan drugom (Ding et al., 1993).

1.2 Stohastički procesi u biofizici

1.2.1 Nasumične varijable i stohastički procesi

U teoriji vjerojatnosti, često je potrebno opisati neku veličinu, x , čija je vrijednost nasumična, ali je ograničena na moguć skup ishoda Ω . Takva veličina se naziva nasumična varijabla i opisuje se kao funkcija $x: \Omega \rightarrow S$, gdje je S prostor stanja. Na primjer, pretpostavimo da bacamo novčić dva puta, te nas zanima koliko novčića je izašlo s glavom prema gore. Broj glava je tada nasumična varijabla koja elementima skupa ishoda $\Omega \equiv \{pp, pg, gp, gg\}$, gdje je p pismo, a g glava, pridružuje elemente prostora stanja $S \equiv \{0, 1, 2\}$. Kako bi pridruživanje bilo jednoznačno, osim prostora ishoda, potrebno je i definirati pripadajuću mjeru vjerojatnosti, $P(\{\omega \in \Omega | x(\omega) \in s\})$, gdje je $s \subseteq S$. Mjera vjerojatnosti je “veličina” (u smislu teorije mjera) skupa ω za koje je vrijednost funkcije unutar s , te se tu veličinu normira tako da je ukupna mjera jedan. U našem primjeru, $P(0) = 1/4$, $P(1) = 1/2$ i $P(2) = 1/4$.

U fizici je često potrebno opisati kako se neka varijabla mijenja u vremenu. Ako je ta varijabla nasumična, koristi se teorija stohastičkih procesa. U matematici, stohastički proces se odnosi na bilo koji uređen skup nasumičnih varijabli, $\{x(t): t \in T\}$, poredanih po nekim indeksima t . Pri tom se skup indeksa može generalizirati i na kontinuiranu veličinu kao što je vrijeme, dok god je skup indeksa mjerljiv, odnosno dok god možemo jednoznačno odrediti da vrijedi, npr. $t_1 < t_2$. Fizikalni smisao tih indeksa kao vremenskih točaka slijedi prirodno iz definicije, te će se u ostatku teksta oni tako i nazivati. Kako bi se olakšala vizualizacija nasumičnih procesa, često se grafički prikazuju samo neke od putanja nasumičnog procesa (u literaturi engleski naziv je *sample path*), i to tako da se za svaku vremensku točku uzme jedan element prostora stanja $x(\omega)$. Putanja nasumičnog procesa je funkcija koja vremenskim točkama pridružuje stanje sustava, $X: T \rightarrow S$. Na slici 1.4 prikazane su tri putanje nasumičnog procesa na primjeru nuklearnog raspada, u kojem broj neraspadnutih jezgri možemo modelirati kao nasumični process $N(\tau)$, u kojem za vremensku koordinatu uzimamo vrijeme normalizirano stopom raspada, $\tau = \lambda t$. Također je prikazana očekivana vrijednost broja neraspadnutih jezgri $\langle N(\tau) \rangle$, koja bi se dobila usrednjavanjem beskonačnog broja putanja u svakoj vremenskoj točki. Može se pokazati da je očekivani broj neraspadnutih jezgri dan poznatom formulom nuklearnog raspada $\langle N(t) \rangle = N_0 \exp(-\tau)$, gdje je N_0 početni broj jezgri.



Slika 1.4. *Primjer nasumičnog procesa – broj neraspadnutih radioaktivnih jezgri u ovisnosti o vremenu. Prikazane su tri moguće putanje (oboјane linije) i očekivana vrijednost broja neraspadnutih jezgri (crna linija), a vrijeme je normalizirano stopom raspada.*

1.2.2 Markovljevo svojstvo i Markovljevi lanci

Većina mnogočestičnih sustava u fizici su sustavi bez pamćenja, čije buduće stanje $x(t + \Delta t)$ ovisi samo o trenutnom stanju sustava $x(t)$, a ne i o načinu na koji je sustav došao u to stanje. U teoriji vjerojatnosti, svojstvo stohastičkog procesa da nema pamćenje, naziva se Markovljevo svojstvo. Primjer nasumičnog procesa koji ima markovljevo svojstvo je uzastopno bacanje novčića i brojanje koliko puta je izašla glava, gdje ukupni broj glava u sljedećem bacanju ovisi samo o tome koliko je puta do sad izašla glava, a ne o tome u koliko bacanja ili kojim redoslijedom je do sad izlazila glava. Primjer nasumičnog procesa koji nije Markovljev je razvrstavanje igrača u parove putem ždrijeba, gdje vjerojatnost određenog para u sljedećem izvlačenju ovisi o tome koja imena su do sad izvučena. Formalno, sustav ima Markovljevo svojstvo ako, za uređen skup vremenskih točaka $\{t_1, t_2, \dots, t_i, t_{i+1} \dots\}$, vjerojatnost da je sustav u trenutku t_{i+1} u stanju x_{i+1} ovisi samo o stanju sustava u trenutku t_i , x_i , a ne i o stanju sustava u pijašnjim stanjima sustava, x_1, x_2, \dots, x_{i-1} , odnosno

$$P(x_{i+1} | x_1, x_2, \dots, x_{i-1}, x_i) = P(x_{i+1} | x_i). \quad (1.1)$$

Ovo svojstvo je izuzetno moćno oruđe za modeliranje različitih sustava u fizici i drugim disciplinama.

Ključan rezultat koji slijedi direktno iz jednadžbe (1.1) i ima ne samo vrlo rasprostranjenu primjenu sam za sebe, nego vodi i na mnoge druge važne rezultate je

Chapman-Kolmogorov jednadžba. Ona se dobiva tako da prvo primijetimo da definicija (1.1) ne ovisi o vrijednosti indeksa, pa vrijedi i za uvjetnu vjerojatnost za varijablu x_{i+2} , ako je poznat ishod varijable x_{i+1} , $P(x_{i+2}|x_{i+1})$. Dalje ćemo, zbog jednostavnosti zapisa, ispustiti oznaku i u indeksu, te pretpostaviti da nas zanima vjerojatnost da se sustav nađe u stanju x_2 ako je počeo u stanju x_0 . Lančanim primjenjivanjem definicije (1.1), te sumiranjem po svim međustanjima dobivamo

$$P(x_2|x_0) = \sum_{x_1 \in S_1} P(x_2|x_1) P(x_1|x_0). \quad (1.2)$$

gdje S_1 označava sve moguće realizacije međustanja x_1 . Ako su nasumične varijable kontinuirane, sumu zamijenjujemo integralom, a vjerojatnosti funkcijama raspodjele vjerojatnosti, te tada imamo

$$p(x_2|x_0) = \int_{-\infty}^{\infty} p(x_2|x_1) p(x_1|x_0) dx_1. \quad (1.3)$$

Rezultati (1.2) i (1.3) su različiti zapisi Chapman-Kolmogorov jednadžbe, a predstavljaju temelj svih rezultata koje ćemo koristiti u ovom poglavlju.

Koncept koji slijedi prirodno iz Chapman-Kolmogorov jednadžbe je Markovljev lanac. Iako u ovom radu nećemo direktno koristiti Markovljeve lance, oni će nam poslužiti kao motivacija za rezultate koje ćemo dalje razmatrati, uključujući Poissonov i difuzijski proces. Pretpostavimo da imamo sustav koji evoluira kroz diskretne vremenske korake $T = \{0, 1, 2, \dots, i, \dots\}$, a u svakom koraku se može naći u jednom od n diskretnih stanja $S_i = \{1, 2, \dots, n\}$. Ako se sustav trenutno nalazi u stanju 1, tad je vjerojatnost da ostane u tom stanju nakon jednog koraka $P(1|1)$, vjerojatnost da prijeđe u stanje 2 je $P(2|1)$, i tako dalje do $P(n|1)$. Analogno, ako je sustav trenutno u stanju 2, $P(1|2)$ je vjerojatnost da prijeđe u stanje 1, $P(2|2)$ je vjerojatnost da ostane u istom stanju i tako sve do vjerojatnosti da prijeđe u n -to stanje, $P(n|2)$. Sličnom konstrukcijom dobivamo vjerojatnosti stanja u kojima sustav može završiti nakon jednog koraka iz bilo kojeg trenutnog stanja. Štoviše, trenutno stanje sustava ne mora biti dobro određeno nego može biti dano vjerojatnostima $P(1), P(2) \dots P(n)$, pa je vjerojatnost da se sustav u sljedećem koraku nađe u stanju α dana sumom vjerojatnosti prijelaza u to stanje iz svih mogućih trenutnih stanja, $P(\alpha) = \sum_{\beta=1}^n P(\alpha|\beta)$. Ovaj rezultat možemo zapisati kao množenje matrice i vektora ako $P(\alpha)$ zamislimo kao jedan redak stupac-vektora koji predstavlja raspodjelu vjerojatnosti, $\mathbf{P} = (P(\beta)|\beta = \{1, 2, \dots, n\})$, a vjerojatnosti prijelaza kao elemente

matrice prijelaza $[P] = (P(\alpha|\beta) \equiv P_{\alpha\beta} | \{\alpha, \beta\} = \{1, 2, \dots, n\})$. Ove definicije ćemo koristiti da zapišemo početnu raspodjelu vjerojatnosti stanja sustava vektorom \mathbf{P}_0 . Tada je raspodjela vjerojatnosti nakon prvog vremenskog intervala $\mathbf{P}_1 = [P]\mathbf{P}_0$. Analogno, nakon dva vremenska intervala imamo $\mathbf{P}_2 = [P]\mathbf{P}_1$. Sad možemo koristiti markovljevo svojstvo da zapišemo raspodjelu nakon dva vremenska koraka preko početne raspodjele, $\mathbf{P}_2 = [P]([P]\mathbf{P}_0)$, a koristeći asocijativnost matrica i činjenicu da u našem primjeru matrica preskoka ne ovisi o indeksu dobivamo $\mathbf{P}_2 = [P]^2\mathbf{P}_0$. Valja primijetiti da se ovaj rezultat može dobiti množeći cijelu jednadžbu (1.2) s vjerojatnošću početnog stanja $P(x_0)$ i interpretirajući rezultat kao redak vektora. Primjenjujući ovakvu proceduru iterativno dobivamo vjerojatnosti stanja za bilo koji vremenski korak $m \in T$,

$$\mathbf{P}_m = [P]^m \mathbf{P}_0. \quad (1.4)$$

S obzirom da je matrica prijelaza konstanta, indekse možemo shvatiti i kao intervale. Kako bismo naglasili da se radi o vremenskim intervalima, uvest ćemo zapis $[P(t)] \equiv [P]^t$ za neki $t \in T$. Ako sustav napravi prvo t_1 , a zatim t_2 koraka, konačna raspodjela dobiva se koristeći elementarno svojstvo eksponencijalnih funkcija s istom bazom,

$$[P(t_1 + t_2)] = [P(t_1)][P(t_2)]. \quad (1.5)$$

Jednadžbe (1.4) i (1.5) predstavljaju osnovna oruđa u teoriji vremenski-diskretnih Markovljevih lanaca, koji su izuzetno korisni za modeliranje mnogih sustava, ali za potrebe ovog rada potrebno napraviti generalizaciju na kontinuirani indeks koji će predstavljati vrijeme.

1.2.3 Kontinuirano vrijeme i Master jednadžba

Rezultat dan jednadžbom (1.5), iako naizgled trivijalan, nam omogućava da uvedemo kontinuirano vrijeme. Počnimo od definicije derivacije matrice,

$$\frac{\partial [P(t)]}{\partial t} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{[P(t + \Delta t)] - [P(t)]}{\Delta t}. \quad (1.6)$$

Sada koristimo jednadžbu (1.5) i dobivamo,

$$\frac{\partial [P(t)]}{\partial t} = \left[\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{[P(\Delta t)] - [I]}{\Delta t} \right] [P(t)], \quad (1.7)$$

gdje je $[I]$ matrica identiteta istog ranga kao i $[P]$. Množeći obje strane jednadžbe (1.7) s početnom raspodjelom stanja \mathbf{P}_0 i definirajući trenutnu raspodjelu stanja po do sada korištenoj konvenciji $\mathbf{P}(t) = [P(t)]\mathbf{P}_0$, dobivamo

$$\frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} = [Q]\mathbf{P}, \quad (1.8)$$

gdje matrica $[Q] = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{[P(\Delta t)] - [I]}{\Delta t}$ opisuje evoluciju sustava i ne ovisi o vremenu. Zbog analogije s jednadžbom (1.2), jednadžba (1.8) se naziva diferencijalna Chapman-Kolmogorov jednadžba (Gardiner, 1985). Ako su u sustavu dopušteni samo prijelazi između susjednih stanja, tada matrica $[Q]$ ima tri-dijagonalni oblik. Uvrštavanjem takve matrice u jednadžbu (1.8) dobiva se tzv. Master jednadžba, koja se često zapisuje u obliku sustava jednadžbi

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(i, t)}{\partial t} = & Q(i|i+1)P(i+1, t) + Q(i|i-1)P(i-1, t) \\ & - [Q(i+1|i) + Q(i-1|i)]P(i, t), \end{aligned} \quad (1.9)$$

gdje je $P(i, t)$ vjerojatnost da se sustav nalazi u stanju $i = \{1, 2, \dots, n\}$ u trenutku t , a $Q(i|j)$ predstavlja vjerojatnost da se sustav nađe u stanju i u trenutku t , ako se do sada nalazio u stanju $j \in \{i-1, i, i+1\}$. Intuitivna interpretacija jednadžbe (1.9) je vrlo jednostavna: prva dva člana predstavljaju prelazak sustava u stanje i iz susjednih stanja, pa povećavaju derivaciju s lijeve strane, dok zadnji član predstavlja prelazak sustava iz stanja i u jedno od susjednih stanja i ima negativni doprinos.

1.2.4 Poissonov proces

Poissonov proces, ili proces brojanja (engl. *counting process*), je nasumični proces koji ima veoma široku primjenu, od sociologije do nuklearne fizike. Kao što i naziv “proces brojanja” implicira, radi se o procesu koji svakom trenutku t pridružuje broj događaja $N(t)$ koji su se dogodili do tog trenutka. Očito je da se radi o vremenski-kontinuiranom Markovljevom procesu s diskretnim skupom stanja. Ovaj proces se može konstruirati na mnogo načina, a ovdje ćemo dati vrlo jednostavan izvod koristeći jednadžbu (1.8). Pretpostavimo da brojimo nasumične događaje u nekom sustavu (npr. brojimo automobile koji prolaze ulicom ispred nas ili fotone koji stižu na detektor) i da vjerojatnost da opazimo novi događaj ne ovisi o broju prijašnjih događaja, a zbog jednostavnosti, ni o proteklom vremenu. Glavni korak u tom izvodu je da, umjesto da direktno gledamo kako se sustav ponaša na proizvoljno dugom

intervalu $[0, t]$, promatramo ponašanje sustava u kratkom intervalu $[t, t + \Delta t]$. Vjerojatnost da smo opazili jedan novi događaj u tom intervalu je proporcionalan duljini intervala, što ćemo označiti kao $P_{+1} = \lambda \Delta t$. Ako je interval mali, tada vjerojatnost da za to vrijeme opazili dva događaja iščezava, jer $P_{+2} \propto \Delta t^2$. Također, brojanje podrazumijeva da nije moguće “izgubiti” već opažen događaj, tako da su jedine mogućnosti ili opažanje jednog događaja, što ima vjerojatnost P_{+1} , ili ne opažanje niti jednog događaja, što ima vjerojatnost $P_{+0} = 1 - P_{+1}$. Uvrštavanjem u izraz za matricu $[Q]$ vidimo da naša aproksimacija jednog događaja vrijedi egzaktno u limesu kad $\Delta t \rightarrow 0$, pa dobivamo

$$[Q] = \begin{bmatrix} -\lambda & \lambda & 0 & \dots \\ 0 & -\lambda & \lambda & \\ 0 & 0 & -\lambda & \ddots \\ \vdots & & & \ddots \end{bmatrix}. \quad (1.10)$$

Raspodjelu stanja definiramo kao stupac vektor

$$\mathbf{P}(t) = \begin{bmatrix} P(N=0, t) \\ P(N=1, t) \\ P(N=2, t) \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad \mathbf{P}(0) = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad (1.11)$$

gdje smo pretpostavili da u početnom trenutku nismo opazili niti jedan događaj. Uvrštavanjem u jednadžbu (1.8) dobivamo sustav jednadžbi

$$\frac{\partial P(N, t)}{\partial t} = \lambda P(N-1, t) - \lambda P(N, t), \quad (1.12)$$

koji se rješava sekvencionalno, te se dobiva raspodjela vjerojatnosti

$$P(N, t) = \frac{(\lambda t)^N}{N!} e^{-\lambda t}. \quad (1.13)$$

Množenjem jednadžbe (1.13) s obje strane s N , odnosno N^2 i sumiranjem po svim događajima, dobiva se očekivani broj događaja, $\langle N \rangle = \lambda t$, odnosno varijanca broja događaja, $\text{var}(N) = \lambda t$. Odavde izlazi da se λ može makroskopski interpretirati kao očekivani broj događaja u jedinici vremena, a naziva se intenzitet Poissonovog procesa. Ovaj izvod je napravljen detaljno kako bi se demonstriralo da se iz svojstava sustava na malim vremenskim skalama dobiva matrica prijelaza (1.10), zatim se iz te matrice, koristeći Markovljevo svojstvo, dobivaju Master jednadžba (1.12) i vjerojatnosti stanja (1.13). Poissonov proces je vrlo intuitivan primjer jer je prostor stanja diskretan, no slična procedura je moguća i za Markovljeve procese s kontinuiranim prostorom stanja.

1.2.5 Kontinuirani prostor stanja

U ovom poglavlju ćemo uvesti kontinuirane Markovljeve procese. Naziv kontinuirani se odnosi na prostor stanja a ne vremenske indekse, npr. Poissonov proces je diskretan, ali vremenski kontinuiran. S obzirom da je prostor stanja neprebrojiv, najčešće $S \equiv \mathbb{R}$, nema smisla govoriti o vjerojatnosti ishoda jer ona uvijek isčezava. Prirodno je kontinuirane procese karakterizirati funkcijom raspodjele vjerojatnosti, što znači da za kontinuirane Markovljeve procese mora vrijediti jednačba (1.3). Prije nego krenemo konstruirati kontinuirane procese, obratimo pozornost na to kako izgledaju putanje diskretnih procesa, a koristit ćemo ponovno primjer Poissonovog procesa. U bilo kojem trenutku t , sustav se nalazi u nekom stanju $N(t) \in \mathbb{N}$, a funkciju raspodjele vjerojatnosti možemo zapisati preko kontinuirane varijable $x \in \mathbb{R}$ kako sumu Diracovih delta-funkcija,

$$p(x, t) = \sum_{N=0}^{\infty} P(N, t) \delta(x - N), \quad (1.14)$$

gdje je vjerojatnost stanja dana jednačbom (1.13), a vrijedi $P(N, t) = \int_{N-\varepsilon}^{N+\varepsilon} p(x, t) dx$ za bilo koju malu, pozitivnu okolinu ε . Vjerojatnost stanja koja nisu cijeli broj isčezava, jer za svaki cijeli N vrijedi $\int_{N+\varepsilon}^{N+1-\varepsilon} p(x, t) dx = 0$. U slučaju Poissonovog procesa, dovoljno je $0 < \varepsilon < 1$, ali ovi rezultati se mogu generalizirati i za slučaj kad dopuštena stanja nisu cijeli brojevi. Pogledajmo što to znači za putanje Poissonovog procesa. Odaberimo neku vremensku točku t , te neki pozitivni vremensku pomak Δt . Koju god točku na putanji odaberemo, moguća su dva ishoda: ili je sustav ostao u istom stanju $N(t + \Delta t) = N(t)$ ili se pomaknuo u jedno od viših stanja $N(t + \Delta t) \leq N(t) + 1$. S druge strane, bez obzira koliko mali vremenski pomak odaberemo, uvijek postoji neiščezavajuća vjerojatnost da se prijelaz u više stanje dogodi. Formalno, za diskretni proces možemo tvrditi da uvijek postoji $\varepsilon > 0$ tako da vrijedi

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int_{|x-x'| > \varepsilon} p(x, t + \Delta t | x', t) dx' = k(x, t), \quad (1.15)$$

gdje moraju postojati x i t , takvi da $k(x, t) \neq 0$. Promotrimo što znači $k(x, t)$. Integral u jednačbi (1.15) predstavlja vjerojatnost da za vrijeme malog intervala Δt sustav dođe u stanje x , no ne uzima u obzir male pomake u ε -okolini od x . To znači da $k(x, t)$ predstavlja ukupnu stopu kojom sustav dolazi u stanje x iz drugih dijelova sustava. U slučaju Poissonovog procesa, u malom vremenskom intervalu, sustav može

doći u stanje x samo prijelazom iz stanja $x' = x - 1$, i to s vjerojatnošću $\lambda\Delta t$, pa je u tom slučaju $p(x, t + \Delta t|x', t) = \lambda\Delta t\delta(x' - (x - 1))$. Integriranjem uz već spomenuti uvjet $0 < \varepsilon < 1$ i uzimanjem limesa, dobivamo $k(x, t) = \lambda$. S obzirom da očito vrijedi $\lambda \neq 0$, Poissonov proces je zaista diskretan Markovljev proces.

Pogledajmo sad što se dogodi ako dopustimo $k(x, t) = 0, \forall \varepsilon > 0$. Kako bismo to razumjeli, zamislimo da se sustav u trenutku $t + \Delta t$ nalazi u točki x gotovo sigurno (dalje u tekstu a.s., od engl. *almost surely*). U kontekstu teorije vjerojatnosti, izraz “gotovo sigurno” znači da je vjerojatnost danog izraza jedan, odnosno bilo koji konačni broj eksperimenata će dati isti rezultat. Na primjer, ako treba nasumično izabrati realni broj između 0 i 1, gotovo je sigurno da nećemo odabrati broj 0.5 jer vjerojatnost tog događaja iščezava, iako se taj broj nalazi u skupu mogućih ishoda. S druge strane, sigurno je da nećemo izabrati broj 6 jer on ne spada u skup mogućih ishoda. Ako je $\int_{|x-x'|>\varepsilon} p(x, t + \Delta t|x', t) dx' = 0$, to znači da se u trenutku t sustav nalazio u nekoj točki iz ε -okolini točke x , a.s. Sad možemo odabrati jednu od točaka iz te regije, te koristiti istu ideju da zaključimo da je sustav u trenutku prije morao biti u njejoj okolini. Ponavljajući ovaj proces za svaki vremenski interval unatrag to početnog vremena, te uzimajući limes $\Delta t \rightarrow 0$, dobivamo putanju koja zadovoljava Weierstrass-Jordan definiciju kontinuirane funkcije. S obzirom da su izbor putanje i konačne točke $x(t)$ bili proizvoljni, slijedi da nasumični proces koji za svaki x, t i $\varepsilon > 0$ zadovoljava

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int_{|x-x'|>\varepsilon} p(x, t + \Delta t|x', t) dx' = 0 \quad (1.16)$$

ima svugdje kontinuirane putanje a.s. Takve procese nazivamo kontinuirani Markovljevi procesi. Valja također primijetiti da je unutar regije $|x - x'| < \varepsilon$ izraz pod integralom u jednadžbi (1.16) konačan (integral funkcije raspodjele vjerojatnosti po cijelom prostoru mora biti jednak jedan). Ako cijelu lijevu stranu shvatimo kao derivaciju putanje i sjetimo se da ε može biti proizvoljno malen, dolazimo do zaključka da kontinuirani procesi imaju putanje koje nisu nigdje derivabilne, a.s.

1.2.6 Difuzijski proces i Wienerov proces

Konstruirajmo sada jedan od najvažnijih kontinuiranih Markovljevih procesa. Prateći diskusiju u (Gardiner, 1985), definirajmo prvo limes

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int_{|x-x'| > \varepsilon} (x - x') p(x, t + \Delta t | x', t) dx' = v(x, t). \quad (1.17)$$

Ako je ε izabran tako da zadovoljava jednadžbu (1.16), to jest da obuhvaća najmanju regiju kroz koju prolaze sve putanje, tada taj limes očito postoji jer je interval $\Delta x = (x - x')$ proizvoljno malen, a $v(x, t) = d\langle x \rangle / dt$ predstavlja trenutnu brzinu kojom se mijenja očekivana vrijednost stohastičke varijable. Kad bi svi viši momenti u Δx iščezavali, tada bi postojala jedna jedina moguća putanja, $x(t) = \langle x(t) \rangle$, te se uopće ne bi radilo o stohastičkom procesu (osim u trivijalnom smislu). Kako bismo konstruirali zaista stohastički proces, neka za drugi moment u Δx vrijedi

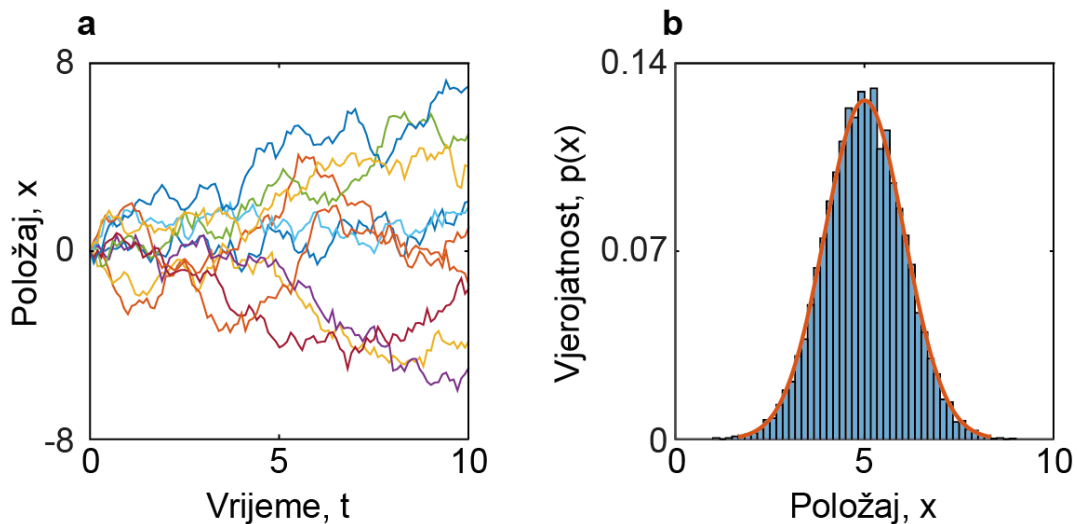
$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int_{|x-x'| > \varepsilon} (x - x')^2 p(x, t + \Delta t | x', t) dx' = \sigma^2(x, t). \quad (1.18)$$

Za ovaj limes znamo da postoji ako se radi o kontinuiranom procesu (isti argument kao i za $v(x, t)$), a $\sigma^2(x, t)$ predstavlja varijancu u pomacima, za koju zahtijevamo da ne iščezava svugdje. Konstruirajmo sada proces koji zadovoljava jednadžbe (1.16), (1.17) i (1.18), a uz to je Markovljev, odnosno zadovoljava jednadžbu (1.3). S obzirom da jednadžbe (1.3) i (1.16) moraju vrijediti za svaki kontinuirani Markovljev proces, obratimo pozornost na jednadžbe (1.17) i (1.18) koje predstavljaju prva dva momenta u pomacima. S obzirom da tražimo vjerojatnost prijelaza koja je potpuno definirana s prva dva momenta, logična pretpostavka je da će ona imati Gaussovu (normalnu) raspodjelu s varijancom $\sigma^2(x, t)$ čija se očekivana vrijednost mijenja brzinom $v(x, t)$, odnosno

$$p(x, t + \Delta t | x', t) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi\Delta t}} e^{-\frac{(x-x'+v\Delta t)^2}{2\sigma^2\Delta t}}. \quad (1.19)$$

Lako je pokazati da ovakva vjerojatnost prijelaza zadovoljava Chapman-Kolmogorov jednadžbu (1.3) jer je umnožak dva Gausijana također Gausijan, te zadovoljava jednadžbu (1.16) jer $\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi\Delta t}} e^{-\frac{(x-x'+v\Delta t)^2}{2\sigma^2\Delta t}} = \delta(x - x')$. Proces čija vjerojatnost prijelaza poštuje Gaussovu raspodjelu naziva se difuzijski proces. Specifični slučaj difuzijskog procesa s $v = 0$ i $\sigma = 1$ naziva Wienerov proces, a od iznimne je važnosti u primjeni. Razlog tome je što se svaki difuzijski proces s konstantnom varijancom, koristeći svojstva Gaussijana, može prostornom translacijom $x' = x - \int v dt$, te skaliranjem vremena $t' = t/\sigma^2$ svesti na Wienerov proces. U stvari se svaki difuzijski proces može transformacijom varijabli svesti na

Wienerov proces, no u slučaju kad varijanca nije konstantna, transformacija nije toliko jednostavna. Takvih slučajeva ćemo se dotaknuti u poglavlju 1.2.10. Na slici 1.5a su prikazane putanje Wienerovog procesa za vremensku koordinatu $t \in [0, 10]$, uz početni položaj $x(0) = 0$, a na slici 1.5b je histogram raspodjele konačnih položaja $x(10)$ za 10000 simulacija i Gaussijan koji aproksimira tu raspodjelu, $p(x, 10|0, 0)$ (jednadžba (1.19)).



Slika 1.5. Putanje Wienerovog procesa. (a) Deset putanja za Wienerov process. (b) Histogram raspodjele položaja u $t = 10$ (plavi stupci) i normalna raspodjela sa srednjom vrijednosti $x_0 = 0$ i varijancom $\sigma^2 = 10$ (crvena linija).

Wienerov proces za vremenski indeks t ćemo označavati s W_t , a često ćemo koristiti Wienerov pomak (engl. *Wiener increment*) $\Delta W = W_{t+\Delta t} - W_t$. Najvažnija svojstva Wienerovog procesa su:

- S obzirom da vrijeme uvijek definiramo pozitivno, početno stanje Wienerovog procesa je $W_0 = 0$, a.s.
- Wienerovi pomaci imaju normalnu raspodjelu s očekivanjem nula i varijancom jednakom vremenskoj razlici, što se formalno zapisuje $\Delta W \sim \mathcal{N}(0, \Delta t)$.
- Putanje Wienerovog procesa su svugdje kontinuirane, što proizlazi iz jednadžbe (1.16) koja vrijedi za sve difuzijske procese, pa tako i za Wienerov.
- Pomak $\Delta W = W_{t+\Delta t} - W_t$, je neovisan od W_{t_0} za svako vrijeme $t_0 < t$. Ova činjenica proizlazi direktno iz Markovljevog svojstva.
- Iz b) i d) slijedi da je Wienerov proces martingala (engl. *Martingale*). Martingala je nasumični proces za koji su sva buduća očekivanja jednaka

trenutnom stanju. Formalno za neki nasumični proces $x(t) \equiv x_t$ i za svaki vremenski pomak Δt , $E[x_{t+\Delta t}|x_t = X] = X$, gdje $E[x_{t+\Delta t}|x_t = X]$ predstavlja očekivanu vrijednost uvjetno na trenutnu realizaciju procesa, $x_t = X$. Martingale su korisni procesi u statističkoj fizici, jer omogućavaju opisivanje lokalnih fluktuacija sustava koje se izgube pri prijelazu na veće prostorne i/ili vremenske skale (na primjer, gibanje krutog tijela se može podijeliti na gibanje centra mase koje podliježe makroskopskim zakonima i martingalu koja opisuje nasumične interakcije molekula tog tijela koje u prosjeku ne utječu na gibanje centra mase). Zbog potpunosti, valja napomenuti da definicija martingale uključuje i uvjet da je proces ograničen u apsolutnoj vrijednosti, odnosno za svako konačno vrijeme t mora vrijediti $E[|x_t|] < \infty$. Ovo je zadovoljeno za Wienerov proces jer apsolutna vrijednosti normalno raspodijeljene varijable poštuje polu-normalnu raspodjelu, pa je $E[|W_t|] = \sqrt{2t/\pi}$.

- f) $E[W_t] = 0$, što slijedi iz a) i e).
- g) Varijanca Wienerovog procesa je jednaka proteklom vremenu, $\text{var}(W_t) = t$. Ovo slijedi iz definicije varijance, $\text{var}(x) = E[x^2] - (E[x])^2$, te svojstava a), b) i f).
- h) Kovarijanca Wienerovog procesa u dvije različite vremenske točke jednaka je manjem od ta dva vremena, $\text{cov}(W_{t_1}, W_{t_2}) = \min(t_1, t_2)$. Da bismo ovo pokazali, pretpostavimo prvo da vrijedi $t_1 < t_2$. Koristeći definiciju kovarijance, $\text{cov}(W_{t_1}, W_{t_2}) = E[(W_{t_1} - E[W_{t_1}])(W_{t_2} - E[W_{t_2}])]$, i svojstvo f), dobivamo $\text{cov}(W_{t_1}, W_{t_2}) = E[W_{t_1}W_{t_2}]$. Sad napišemo $W_{t_2} = (W_{t_2} - W_{t_1}) + W_{t_1}$, pa dobivamo $\text{cov}(W_{t_1}, W_{t_2}) = E[W_{t_1}(W_{t_2} - W_{t_1})] + E[(W_{t_1})^2]$. Međutim, ako u svojstvo d) i uvrstimo $t_0 = t_1$ i $\Delta t = t_2 - t_1$, vidimo da su pomaci W_{t_1} i $(W_{t_2} - W_{t_1})$ međusobno nezavisni, a iz g) imamo $E[(W_{t_1})^2] = t_1$, pa dobivamo $\text{cov}(W_{t_1}, W_{t_2}) = t_1$. Ponavljajući istu proceduru pod pretpostavkom $t_1 > t_2$ smo dokazali navedenu tvrdnju.
- i) Putanje Wienerovog procesa su samoslične pod skaliranjem ili inverzijom u vremenu. Za bilo koji parametar skaliranja $\alpha > 0$, $Y_t = W_{\alpha t}/\sqrt{\alpha}$ je također Wienerov proces, isto kao i proces inverzan u vremenu, $Z_t = tW_{1/t}$. Ovo slijedi iz svojstava a) i b). Također, zbog toga što su putanje Wienerovog

proces kontinuirane, unutar svakog Wienerovog pomaka može se dodati proizvoljan broj točaka koje leže na istoj putanji. Pretpostavimo je poznata realizacija Wienerovog pomaka $\Delta W = X$ na intervalu $[t, t + \Delta t]$. Tada taj interval možemo podijeliti na podintervale $[t, t + h]$ i $[t + h, t + \Delta t]$ s Wienerovim pomacima na tim podintervalima $\Delta W_1 = hX/\Delta t + H$ i $\Delta W_2 = (\Delta t - h)X/\Delta t - H$, gdje je $H \sim \mathcal{N}\left(0, \sqrt{h(\Delta t - h)/\Delta t}\right)$. Bez obzira na realizaciju nasumične varijable H , putanja koja sadrži pomake ΔW_1 i ΔW_2 predstavlja istu realizaciju originalnog Wienerovog procesa. Ovdje navedena svojstva su od velike važnosti pri numeričkom simuliranju difuzijskih procesa.

1.2.7 Reakcijsko-difuzijska jednadžba

Prije nego krenemo raspravljati o primjeni formalizama koje smo uveli u prijašnjim poglavljima, treba još promotriti i najkompliciraniji slučaj od interesa. To je slučaj kad se promjene u našem sustavu, tj. nekoj koordinati x , mogu dogoditi i kontinuiranim pomicanjem u okolini x i skokovima iz drugih dijelova sustava. Mjera koja nam opisuje sustav je raspodjela vjerojatnosti $p(x, t)$, i vrijeme i koordinata su kontinuirani, a cilj je dobiti diferencijalnu jednadžbu koja opisuje kako se ta raspodjela vjerojatnosti mijenja u vremenu. Treba napomenuti da, s obzirom da tražimo diferencijalnu jednadžbu, moramo zadati i početni uvjet. Zbog toga bi bilo ispravno tvrditi da tražimo uvjetnu vjerojatnost $p(x, t|x_0, t_0)$ uz danu početnu raspodjelu $p(x_0, t_0)$. Zbog jednostavnosti zapisa nećemo pisati kao uvjetnu vjerojatnost, nego ćemo ju ostaviti implicitnom.

Pogledajmo prvo doprinose raspodjeli vjerojatnosti oko x koji dolaze zbog diskretnih nasumičnih procesa, odnosno “skokova” sustava iz područja izvan ε -okoline točke x u nju ili obratno. U poglavlju 1.2.3 smo već napisali kako se mijenja vjerojatnost nekog stanja u ovisnosti o tome koliko brzo sustav prelazi u to ili iz tog stanja, ali u kontekstu diskretnog prostora stanja i prijelaza između susjednih stanja. Radi se o Master jednadžbi (1.9), i ovdje ćemo napisati njenu najopćenitiju formu. Ako je prostor stanja kontinuiran i dopušteni su prijelazi između bilo koje dvije točke u sustavu, tada ona glasi

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = \int [q(x|x', t)p(x', t) - q(x'|x, t)p(x, t)] dx', \quad (1.20)$$

gdje su diferencijalni elementi prijelaza definirani limesom $q(x|x', t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} p(x, t + \Delta t|x', t)$, a imaju istu intuitivnu interpretaciju kao i elementi matrice prijelaza u jednadžbi (1.9). Ovdje smo, zbog jednostavnosti ispustili vremensku ovisnost u diferencijalnim elementima prijelaza. Pozitivan član na desnoj strani se često naziva izvor (engl. *source*) jer, ako vjerojatnost zamislimo kao broj nekih čestica, govori koliko brzo one dolaze u regiju oko točke x . Analogno, član s negativnim predznakom se naziva odvod (engl. *sink*) jer govori koliko brzo takve čestice odlaze iz te regije.

Osim skokova, dopuštamo i male pomake u blizini točke x koji su opisani difuzijskim procesom. Da bismo opisali kako oni utječu na raspodjelu vjerojatnosti $p(x, t)$, razvit ćemo elemente prijelaza u Master jednadžbi (1.20) oko x . Počnimo tako da elemente prijelaza zapišemo preko malog pomaka, $\Delta x = (x - x')$, i početne točke x' , odnosno $q(x|x') = q(x'; \Delta x)$. Uz ovakvu transformaciju, jednadžba (1.20) glasi

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = \int q(x - \Delta x; \Delta x) p(x - \Delta x, t) d\Delta x - p(x, t) \int q(x; -\Delta x) d\Delta x, \quad (1.21)$$

gdje smo pretpostavili da je sustav puno veći od Δx , pa ne moramo paziti na granice integracije. Sad koristimo Taylorov razvoj u prvom integralu,

$$\begin{aligned} \frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = & \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n!} \int \Delta x^n \frac{\partial^n}{\partial x^n} [q(x; \Delta x) p(x, t)] d\Delta x \\ & - p(x, t) \int q(x; -\Delta x) d\Delta x. \end{aligned} \quad (1.22)$$

Ako pretpostavimo da $p(x, t)$ slabo varira u x na intervalu $\pm \Delta x$, nulti član u sumi se dokine sa zadnjim članom u jednadžbi (1.22). Time dobivamo razvoj Master jednadžbe po njenim momentima prijelaza $m_n(x) = \int \Delta x^n q(x; \Delta x) d\Delta x$, odnosno Kramers-Moyal razvoj (Kramers, 1940; Moyal, 1949; Van Kampen, 1992):

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n!} \frac{\partial^n}{\partial x^n} [m_n(x) p(x, t)], \quad (1.23)$$

Prisjetimo se da jednadžbe (1.17) i (1.18) predstavljaju prva dva momenta diferencijalnih elemenata prijelaza, odnosno $m_1(x) = v(x)$ i $m_2(x) = \sigma^2(x)$. Ako se radi o difuzijskom procesu, zadržavamo samo ta dva momenta, pa jednadžba (1.23) daje Fokker-Planck jednadžbu,

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} \left[v(x)p(x, t) - \frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial x} \sigma^2(x)p(x, t) \right], \quad (1.24)$$

gdje se izraz u uglatoj zagradi $j(x, t) = v(x)p(x, t) - \frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial x} \sigma^2(x)p(x, t)$, često naziva struja vjerojatnosti, zbog analogije sa strujom elektrona u elektrodinamici ili strujom tekućine u hidrodinamici.

Kombiniranjem Master jednadžbe (1.20) i Fokker-Planck jednadžbe (1.24), dobivamo reakcijsko-difuzijsku jednadžbu (Gardiner, 1985),

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} j(x, t) + \int [q(x|x', t)p(x', t) - q(x'|x, t)p(x, t)] dx'. \quad (1.25)$$

Ovo je dopušteno zbog uvjeta (1.16) koji odvaja lokalne fluktuacije dane prvim članom od skokova danih drugim članom. Izraz (1.25) predstavlja osnovu na kojoj će se temeljiti gotovo svi rezultati dobiveni u ostatku ovog rada.

1.2.8 Brownovo gibanje u fizici i Langevinova jednadžba

U ovom poglavlju ćemo pokazati kako se do sad prikazani koncepti mogu koristiti kako bi se modeliralo nasumično gibanje u fizici. Konkretno, želimo koristiti teoriju Markovljevih procesa kako bismo opisali ponašanje tijela u termodinamičkoj ravnoteži s mnoštvom drugih, manjih, tijela u njegovoj okolini koja se sudaraju s njim, tzv. Brownovo gibanje. U ovom izvodu ćemo uglavnom pratiti diskusiju u (Van Kampen, 1992). Jedino što za sad zahtijevamo od tog tijela je da ono mora biti dobro opisano zakonima klasične fizike, odnosno da se mogu zanemariti kvantni i relativistički efekti. Zbog jednostavnosti, promatrajmo tijelo jedinične mase koje se giba u jednoj dimenziji brzinom $v(t)$ i osjeća utjecaj vanjskih sila koje djeluju na njega, čija je rezultanta F . Ono također međudjeluje s ostalim tijelima u njegovoj okolini tako da se s njima sudara, što stvara otpor njegovom gibanju koji je proporcionalan frekvenciji tih sudara, odnosno brzini kojom se tijelo giba kroz medij. Konstanta te proporcionalnosti se naziva koeficijent trenja, γ , tako da je sila otpora $F_{\text{otpor}} = -\gamma v$. Prema fluktuacijsko-disipacijskom teoremu, otpor je posljedica fluktuacija u sustavu. Intuitivno, te fluktuacije su rezultat činjenice da se okolina sastoji od mnoštva diskretnih čestica, od kojih svaka ima svoju putanju koja ovisi o interakcijama sa svim ostalim česticama. Ako je sustav u ravnoteži, fluktuacije možemo zamijeniti nasumičnom silom, $L(t)$. Jednadžba gibanje za ovo tijelo je, prema 2. Newtonovom zakonu,

$$\frac{dv}{dt} = F - \gamma v + L(t). \quad (1.26)$$

Kako bismo ovu jednadžbu primijenili na opis Brownovog gibanja, promotrimo prvo tri glavne prostorno-vremenske skale na kojima se može opisati klasično tijelo.

- a) Makroskopska skala. Na ovoj skali, interval između sudara s drugim česticama je mnogo manji od promatrane vremenske skale, a ti sudari uzrokuju pomake koji su mnogo manji nego što je promatrana prostorna skala. U tom slučaju, okolinu zamišljamo kao kontinuirani medij koji pruža otpor, a fluktuacije su zanemarive. Putanje su determinističke funkcije vremena, odnosno vrijedi $v(t) = \langle v(t) \rangle$. Ova skala je pogodna za opisivanje tijela velikih masa u medijima u kojima postoje aerodinamički ili hidrodinamički efekti, kao što su projektili ili vozila. Analogni formalizam se koristi u klasičnoj elektrodinamici za opisivanje R-C krugova u režimu velikih struja gdje su fluktuacije zbog diskretnosti nosioca naboja zanemarive. U kontekstu biologije, na ovoj skali se opisuje biomehanika, odnosno gibanje organa u organizmu ili cijelih organizama u okolišu.
- b) Mezoskopska skala. Na ovoj skali dolaze do izražaja fluktuacije sustava, međutim čestice koje ih uzrokuju su mnogo manje od promatranog tijela. Zbog toga na ovoj skali ne promatramo detalje sudara s česticama u okolini, nego smatramo da su oni svi trenutačni i lokalni. Sudari su nasumični, a čestice medija smatramo identičnim, tako da svi sudari imaju istu raspodjelu vjerojatnosti. Ova skala se koristi upravo za opisivanje Brownovog gibanja, pa je nama od najvećeg interesa. I u ovom slučaju postoji analogija s elektrodinamikom, konkretno magnetizmom (Gro/n, 1975). U kontekstu biologije, na ovoj skali se opisuje ponašanje organela u stanici ili stanica u tkivima.
- c) Mikroskopska skala. Na ovoj skali su dimenzije čestica u okolini usporedive s veličinom tijela koje proučavamo, a trajanje njihovih interakcija je dugo u usporedbi s vremenom promatranja. S obzirom da je na ovoj skali potrebno opisivati (obično komplicirane) interakcije između mnoštva čestica, često se za rješavanje koriste numeričke metode kao što su simulacije molekularne dinamike. U kontekstu biologije, na ovoj skali se opisuju interakcije molekula i domena u proteinima pri konformacijskim promjenama ili interakcijama s drugim makromolekulama.

Kao što smo već spomenuli, u ovom radu ćemo proučavati Brownovo gibanje, koje se događa na mezoskopskoj skali. Ova činjenica nam omogućuje da odredimo svojstva nasumične sile $L(t)$. Prvo svojstvo koje ona mora imati je da iščezava na makroskopskim skalama, za što je dovoljno zahtijevati da vrijedi

$$E[L(t)] = 0. \quad (1.27)$$

Zatim, zahtijevamo da su sudari trenutačni na vremenskim skali na kojima promatramo tijelo. Također, s obzirom da je $L(t)$ stohastički proces, njegova varijanca ne smije iščezavati. Ova dva svojstva možemo formalno izraziti jednačinom

$$E[L(t)L(t')] = \sigma^2 \delta(t - t'). \quad (1.28)$$

Nasumični proces $L(t)$ s ovim svojstvima u kontekstu jednačine (1.26) nazivamo Langevinova sila, odnosno jednačinu (1.26) s ovako definiranom nasumičnom silom zovemo Langevinova jednačina. Općenito, diferencijalna jednačina u kojoj se kao koeficijenti pojavljuju stohastički procesi se naziva stohastička diferencijalna jednačina.

Za sad još uvijek nismo eksplicitno odredili $L(t)$, ali su prva dva momenta dovoljna da uspostavimo fizikalnu vezu između otpora i nasumične sile. Zbog jednostavnosti staviti ćemo da je vanjska sila jednaka nuli ($F = 0$) i da je početni uvjet $v(0) = v_0$. Tada se jednačina (1.26) može riješiti eksplicitno,

$$v(t) = v_0 e^{-\gamma t} + e^{-\gamma t} \int_0^t dt' e^{-\gamma(t-t')} L(t'). \quad (1.29)$$

Pretpostavimo da imamo ansambl čestica koje sve imaju istu početnu brzinu v_0 , te s obzirom da Langevinova sila ne ovisi o brzini, smijemo usrednjiti jednačinu (1.29) po tom ansamblu. Zbog svojstva (1.27) stohastički dio iščezava, pa za srednju vrijednost ansambla dobivamo

$$\langle v(t) \rangle_{v_0} = v_0 e^{-\gamma t}, \quad (1.30)$$

što odgovara rješenju u makroskopskom režimu. Kako bismo odredili σ^2 u jednačini (1.28), usrednjit ćemo po istom ansamblu kvadrat brzine iz jednačine (1.29):

$$\langle v(t)^2 \rangle_{v_0} = v_0^2 e^{-2\gamma t} + \int_0^t dt' \int_0^t dt'' e^{-\gamma(t-t')} e^{-\gamma(t-t'')} \langle L(t') L(t'') \rangle. \quad (1.31)$$

Nakon uvrštavanja svojstva (1.28) te rješavanja integrala dobivamo

$$\langle v(t)^2 \rangle_{v_0} = v_0^2 e^{-2\gamma t} + \frac{\sigma^2}{2\gamma} (1 - e^{-2\gamma t}). \quad (1.32)$$

Za sustav u ravnoteži, odnosno ako $t \rightarrow \infty$, dobivamo

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle v(\infty)^2 \rangle = \frac{\sigma^2}{2\gamma}. \quad (1.33)$$

Sad možemo koristiti ekviparticijski teorem, koji glasi da za klasični sustav u termičkoj ravnoteži opisanom svi neovisni kvadratni članovi u energiji nose jednaku srednju energiju, $E = k_B T/2$. U našim jedinicama je prosječna kinetička energija je $\langle v^2 \rangle/2$, pa dobivamo $\sigma = \sqrt{2k_B T \gamma}$. Ovaj izraz povezuje fluktuacije, koje su mikroskopsko svojstvo sustava s trenjem, γ , koje je makroskopsko svojstvo.

Ovime smo odredili prva dva momenta nasumične sile $L(t)$. Iako u najopćenitijem slučaju i dalje ne znamo više momente, a time i egzaktnu raspodjelu od $L(t)$, u kontekstu Brownovog gibanja možemo pretpostaviti da je ona normalna, odnosno da je u potpunosti određena s njena prva dva momenta. Kako bismo razumjeli zašto je ta pretpostavka ispravna, sjetimo se sada da je porijeklo nasumične sile zapravo mnoštvo sudara čestica medija s promatranim tijelom. Te čestice imaju determinističke putanje, no s obzirom da ih je mnogo i da su te putanje komplicirane, sudare modeliramo kao nasumične događaje. Na mezoskopskoj skali, za vrijeme nekog malog vremenskog intervala se dogodi mnogo sudara, a sila $L(t)$ bilježi ukupni doprinos tih sudara u jednadžbi gibanja (1.26). Medij se sastoji od različitih vrsta međusobno identičnih čestica (npr. molekule otapala, otopljeni ioni, različiti proteini i masti...), pa se nasumična sila može rastaviti na doprinose svake od tih vrsta, $L = \sum_i L_i$, gdje L_i predstavlja ukupan doprinos sili od svih čestica iste vrste. S obzirom da sudara ima mnogo više nego vrsta čestica, možemo reći da je i svaki od doprinosa iste vrste čestica, L_i , rezultanta mnoštva sudara koji vrše međusobno identične čestice, odnosno koji imaju istu raspodjelu vjerojatnosti. Sad koristimo centralno-granični teorem i zaključujemo da je svaki L_i normalno raspodijeljena nasumična varijabla. Time smo opravdali našu pretpostavku, jer je suma normalno raspodijeljenih nasumičnih varijabli također normalno raspodijeljena. Ovime smo uspjeli u potpunosti karakterizirati mezoskopski sustav bez da uopće opisujemo što se događa na mikroskopskoj skali, jer iako ne znamo varijancu svakog od doprinosa L_i , ukupnu varijancu možemo odrediti makroskopskim opservacijama trenja u sustavu, kao što je već opisano.

Ako je nasumična sila normalno raspodijeljena, koristeći (1.27) i (1.28), jednadžbu (1.26) možemo zapisati kao

$$\frac{dv}{dt} = F - \gamma v + \sqrt{2k_B T \gamma} \eta(t), \quad (1.34)$$

gdje je $\eta(t)$ Gaussov bijeli šum za koji vrijede svojstva: $E[\eta(t)] = 0$ te $E[\eta(t)\eta(t')] = \delta(t - t')$. Ova jednadžba ima smisla samo ako je trenje konstantno, slučaj kad nije konstantno ćemo promatrati u sljedećem poglavlju. Nadalje, promotrimo tu jednadžbu u režimu jakog gušenja. Taj režim se postiže pri malom Reynoldsovom broju (Van Kampen, 1992), a karakterizira ga iščezavanje inercijskog člana. Drugim riječima, u režimu jakog gušenja, ukupna sila koja djeluje na tijelo se “potroši” na savladavanje trenja, pa je brzina u svakom trenutku konstantna ($dv/dt = 0$). U tom slučaju za položaj tijela vrijedi

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{\gamma} + \sqrt{\frac{2k_B T}{\gamma}} \eta(t). \quad (1.35)$$

Promotrimo sada kako se ponašaju pomaci čestice $\Delta x = x(t + \Delta t) - x(t)$ u nekom intervalu $[t, t + \Delta t]$ koji je dovoljno mali da smijemo uzeti $\Delta t^2 \rightarrow 0$. Pretpostavimo, kao i za brzine, da imamo ansambl čestica kojima je poznat početni položaj, $x(t) = x_0$, te usrednjimo pomak po tom ansamblu. Analogno jednadžbi (1.30), dobivamo za očekivani pomak

$$\langle \Delta x \rangle_{x_0} = \frac{1}{\gamma} \int_t^{t+\Delta t} F(t') dt'. \quad (1.36)$$

Rezultat za kvadrat pomaka dobivamo analogno jednadžbama (1.31) i (1.32),

$$\langle \Delta x^2 \rangle_{x_0} = \mathcal{O}(\Delta t^2) + \frac{2k_B T}{\gamma} \Delta t, \quad (1.37)$$

gdje zanemarujemo kvadratne članove u vremenskom koraku. Kombinirajući jednadžbe (1.36) i (1.37) zaključujemo da pomaci u položaju u prosjeku poštuju makroskopske zakone, a da fluktuacije daju varijancu koja je proporcionalna vremenskom intervalu. Drugim riječima, jednadžbe (1.36) i (1.37) su ekvivalentne jednadžbama (1.18) i (1.19) ako stavimo $v(x, t) = F/\gamma$ i $\sigma^2 = 2k_B T/\gamma$, odnosno $x(t)$ je difuzijski proces. Iste rezultate moguće je i dobiti bez pretpostavke jakog gušenja, vidi (Van Kampen, 1992). Štoviše, znamo da svaki difuzijski proces postaje Wienerov proces uz translaciju položaja i skaliranje vremena, pa lako dobivamo njegovu vezu s članom koji predstavlja bijeli šum,

$$\Delta W = \int_t^{t+\Delta t} \eta(t') dt'. \quad (1.38)$$

U matematičkoj literaturi se često koristi diferencijalni Wienerov pomak, koji se definira kao limes $dW \equiv \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \Delta W$, pa se jednačba (1.35) također može zapisati u diferencijalnom obliku

$$dx = \frac{F}{\gamma} dt + \sqrt{\frac{2k_B T}{\gamma}} dW, \quad (1.39)$$

a njeno rješenje je

$$x(t) = x(0) + \frac{1}{\gamma} \int_0^t F(t') dt' + \sqrt{\frac{2k_B T}{\gamma}} \int_0^t dW. \quad (1.40)$$

Mi ćemo u nastavku preferirati oblik (1.35), a treba imati na umu da bijeli šum, a time i nasumični proces $x(t)$ nasljeđuju svojstva Wienerovog procesa opisana u poglavlju 1.2.8.

Prisjetimo se izvoda reakcijsko-difuzijske jednačbe danog u poglavlju 1.2.7. U slučaju kad promatramo tijelo koje se samo nasumično giba u nekom mediju bez skokovitih promjena stanja, koristimo Fokker-Planck jednačbu (1.24) kako bismo opisali raspodjelu vjerojatnosti njenog položaja. Koristeći vrijednosti iz jednačbe (1.35), za Brownovu česticu u režimu jakog gušenja i uz vanjsku silu $F(x)$ dobivamo

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{F(x)}{\gamma} p(x, t) - \frac{k_B T}{\gamma} \frac{\partial p(x, t)}{\partial x} \right]. \quad (1.41)$$

Primijetimo da se u našem slučaju trenje γ može izlučiti iz zagrade, te ono u ovom režimu definira vremensku skalu. Kao i prije, izraz u zagradi predstavlja struju vjerojatnosti koja u našem slučaju ima oblik $j(x, t) = \left[F(x)p(x, t) - k_B T \frac{\partial p(x, t)}{\partial x} \right] / \gamma$. Jednačba (1.41) je u potpunosti ekvivalentna jednačbi (1.35), jer se obje dobivaju iz Master jednačbe ako pomaci imaju normalnu raspodjelu. Obratimo još pozornost na to što se dogodi u slučaju slobodne difuzije, $F = 0$, i usporedimo s jednačbom difuzije,

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}. \quad (1.42)$$

Vidimo da su jednačbe (1.41) i (1.42) povezane Einsteinovom relacijom $D = k_B T / \gamma$, a ta veza se vidi i ako stavimo za očekivani kvadrat pomaka $\langle \Delta x^2 \rangle = 2D\Delta t$ i usporedimo s jednačbom (1.37).

1.2.9 Specijalni slučajevi, stacionarno rješenje i poopćenje na više dimenzija

Do sada smo pretpostavili da je sav šum u sustavu termodinamičke prirode, odnosno posljedica sudara mnoštva čestica u mediju s promatranim tijelom. Drugim riječima, pretpostavili smo da je vanjska sila $F(x)$ deterministička. Međutim, nije teško zamisliti da u realnom fizikalnom sustavu postoje i vanjske smetnje, a ne samo šum uzrokovan mikroskopskim interakcijama unutar sustava. U tom slučaju, vanjsku silu možemo rastaviti na deterministički i stohastički dio, $F = f_{\text{det}} + f_{\text{st}}$. Analogno konstrukciji jednadžbe (1.26), zahtijevamo da deterministički dio u potpunosti određuje očekivanu vrijednost varijable, tako da vrijedi $d\langle x \rangle / dt = f_{\text{det}}$, odnosno $\langle f_{\text{st}} \rangle = 0$. Ako je stohastički dio uzrokovan trenutačnim interakcijama na izvoru sile i ima varijancu σ_{st}^2 , odnosno $\langle f_{\text{st}}(t)f_{\text{st}}(t') \rangle = \sigma_{\text{st}}^2 \delta(t - t')$, tada se taj šum može absorbirati u Langevinovu silu, koja sad ima varijancu $(2k_B T \gamma + \sigma_{\text{st}}^2)$. Ako se vanjska smetnja može dobro opisati Gaussovim bijelim šumom, $f_{\text{st}} = \sigma_{\text{st}} \eta'$, tada ponovno možemo zbrojiti varijance vanjskog i unutarnjeg šuma pa jednadžba (1.35) postaje

$$\frac{dx}{dt} = \frac{f_{\text{det}}}{\gamma} + \sqrt{\left(\frac{\sigma_{\text{st}}}{\gamma}\right)^2 + \frac{2k_B T}{\gamma}} \eta''(t). \quad (1.43)$$

Ovdje η' i η'' imaju ista svojstva kao i η . U praksi se često i deterministički član i varijanca određuju empirijski, a svi do sada izvedeni rezultati su jednako primjenjivi na empirijske jednadžbe dok god stohastički proces ima normalnu raspodjelu.

Fokker-planck jednadžba nema rješenje zatvorenog oblika za proizvoljnu funkciju sile $F(x)$, te se često raspodjela $p(x, t)$ dobiva numeričkim simuliranjem varijable $x(t)$ mnogo puta. Iznimka koju treba spomenuti je slučaj linearne Fokker-Planck jednadžbe (Van Kampen, 1992), u kojoj je sila polinom prvog reda, $F(x) = f_0 + f_1 x$, a intenzitet šuma konstantan. Kad je $f_1 > 0$, $x(t)$ može naći proizvoljno daleko od početnog položaja za proizvoljno dugo vrijeme. S druge strane ako $f_1 < 0$, tada se $x(t)$ uvijek kreće prema stacionarnoj točki f_0/f_1 , a to svojstvo se naziva engl. *mean reversal*, te se ovako definiran proces $x(t)$ naziva Orstein-Uhlenbeck proces.

Vidimo da možemo dosta naučiti o raspodjeli vjerojatnosti ako promotrimo kamo teži varijabla ako sustav pustimo da evoluira proizvoljno dugo. Prateći ovo razmišljanje, dobivamo važan rezultat koji se često koristi u fizici, a to je stacionarna raspodjela vjerojatnosti $p_s(x) \equiv \lim_{t \rightarrow \infty} p(x, t)$. Ako limes postoji i rezultat je

integrabilan, ta se raspodjela dobiva nametanjem $\frac{\partial p(x,t)}{\partial t} = 0$ u jednadžbi (1.41).

Općeniti izraz je

$$p_s(x) = p_0 \exp \left[\frac{\int F(x') dx'}{k_B T} \right], \quad (1.44)$$

gdje je p_0 normalizacijska konstanta. Ako integral u eksponentu shvatimo kao potencijal, jednadžba (40) odgovara Boltzmannovoj raspodjeli. Za Orstein-Uhlenbeck proces, stacionarna raspodjela je normalna s očekivanom vrijednosti f_0/f_1 i varijancom $\sqrt{k_B T/f_1}$.

Svi do sada izvedeni rezultati uključuju samo gibanje u jednoj dimenziji. U slučaju kada je koordinata dana d -dimenzionalnim vektorom $\mathbf{x} = (x_1, x_2 \dots x_d)$, lako je generalizirati do sada izvedene rezultate na slučaj više dimenzija. Pretpostavimo također da u sustavu djeluje m različitih (bijelih) šumova i definirajmo vektor šuma $\boldsymbol{\eta} = (\eta_1, \dots, \eta_m)$ sa svojstvom da su sve komponente međusobno nezavisne, odnosno $\langle \eta_i \eta_j \rangle = \delta_{ij}$. Tada je Langevinova jednadžba koja opisuje taj sustav:

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{v}(\mathbf{x}) + [B] \boldsymbol{\eta}(t), \quad (1.45)$$

gdje je $\mathbf{v}(\mathbf{x})$ sada n -dimenzionalni vektor, a $[B]$ je $m \times d$ matrica koja je za sad i dalje konstantna. Ekvivalentna Fokker-Planck jednadžba glasi:

$$\frac{dp}{dt} = -\nabla \cdot \left[\mathbf{v}(\mathbf{x}) p(\mathbf{x}, t) - \frac{1}{2} [B][B]^T \nabla p \right], \quad (1.46)$$

gdje ∇ označava derivaciju duž koordinata, odnosno $\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x_1}, \dots, \frac{\partial}{\partial x_n} \right)$.

1.2.10 Multiplikativni šum, Ito i Stratonovich interpretacija

Pogledajmo sada što ako intenzitet šuma nije konstantan nego neka funkcija, $\sigma^2 = B(x)$. Langevinova jednadžba sada glasi:

$$\dot{x} = v(x) + B(x)L(t). \quad (1.47)$$

Uvrštavanjem članova $v(x)$ i $B(x)$ u Fokker-Planck jednadžbu dobivamo:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{\partial}{\partial x} [v(x)p(x) + B(x)B'(x)p(x)] + \frac{B^2}{2} \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}. \quad (1.48)$$

No, ako se sada iz Fokker-Planck jednadžbe pokušamo dobiti Langevineovu jednadžbu imamo:

$$\dot{x} = v(x) + B(x)B'(x) + B(x)L(t). \quad (1.49)$$

Ovo je kontradikcija: da bismo dobili početnu jednadžbu (1.47), $B'(x)$ bi trebao iščezavati, tj. šum bi trebao imati konstantni intenzitet. Drugim riječima, jednadžba (1.29) nije dobro definirana. Bez da se kaže kako se rješava stohastički integral, ona predstavlja “besmisleni nakupinu simbola” (Van Kampen, 1981). Sjetimo se da nasumičnu funkciju $L(t)$ možemo zamisliti kao slijed delta funkcija koje stižu u nasumičnim trenucima, a svaka delta funkcija u $L(t)$ uzrokuje skok u $x(t)$. No ako je šum funkcija varijable $x(t)$, iz jednadžbe (1.47) nije jasno treba li u funkciju $B(x)$ uvrstiti vrijednost varijable prije ili nakon nailaska delta funkcije ili možda treba uzeti srednju vrijednost. Ovisno o tome koju opciju izaberemo dobit ćemo različite Fokker-Planck jednadžbe. Stratonovich je odlučio uzeti srednju vrijednost pri čemu imamo:

$$\begin{aligned} x(t + \Delta t) - x(t) &= v(x(t))\Delta t + B\left(\frac{x(t + \Delta t) + x(t)}{2}\right) \int_t^{t+\Delta t} L(t')dt'. \end{aligned} \quad (1.50)$$

Ako na ovaj način shvatimo jednadžbu (1.47), dobit ćemo Fokker-Planck jednadžbu oblika:

$$\frac{\partial p(v, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}(v(x) + B(x)B'(x))p + \frac{\partial^2}{\partial x^2}B(x)^2p. \quad (1.51)$$

Za razliku od Stratonovicha, Ito je uzео vrijednost varijable prije nailaska delta funkcije. On je jednadžbu (1.47) shvatio kao

$$x(t + \Delta t) - x(t) = v(x(t))\Delta t + B(x(t)) \int_t^{t+\Delta t} L(t')dt'. \quad (1.52)$$

Ovakvom interpretacijom dobivamo Fokker-Planck jednadžbu oblika:

$$\frac{\partial p(v, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}v(x)p + \frac{\partial^2}{\partial x^2}B(x)^2p. \quad (1.53)$$

U literaturi se obično za jednadžbu napisanu kao (1.29) pretpostavlja Ito interpretacija. Ako se radi o Stratonovich interpretaciji, jednadžbu (1.47) treba zapisati kao:

$$\dot{x} = v(x) + B(x) \circ L(t), \quad (1.54)$$

gdje znak ' \circ ' označava Stratonovich interpretaciju (Van Kampen, 1992). Iako za Langevinove jednadžbe s konstantnim šumom, kao što je (1.35) nema smisla navoditi interpretaciju, treba biti na oprezu kad se na takvim jednadžbama rade algebarske operacije (npr. promjena koordinatnog sustava, računanje funkcije udaljenosti itd.).

Ukoliko se za rezultat dobije nova jednađba u kojoj matrica šumova više nije konstantna, takva jednađba se mora shvatiti u Stratonovich interpretaciji. Prednost Stratonovich interpretacije je da se u njoj mogu raditi sve algebarske operacije na isti način kao što bi se radile da se radi o običnoj diferencijalnoj jednađbi. Da bi se dobila Ito interpretacija stohastičke diferencijalne jednađbe oblika $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{v}(\mathbf{x}) + [B(\mathbf{x})] \circ \boldsymbol{\eta}(t)$, potrebno je s desne strane dodati još jedan deterministički član koji se naziva spuriozni drift, engl. *spurious drift*. Njega dobivamo tako da prvo šum zapišemo kao $\sum_{i=1}^m \mathbf{V}_i(\mathbf{x})\eta_i$, gdje su \mathbf{V}_i vektor stupci matrice $[B]$. Zatim se dodatni član računa kao (Hsu, 2002):

$$\mathbf{A}(\mathbf{x}) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^m \nabla_{\mathbf{V}_i} \mathbf{V}_i(\mathbf{x}), \quad (1.55)$$

gdje $\nabla_{\mathbf{V}_i}$ označava usmjerenu derivaciju duž vektora \mathbf{V}_i . Ta jednađba u Ito interpretaciji tada glasi $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{v}(\mathbf{x}) + \mathbf{A}(\mathbf{x}) + [B(\mathbf{x})]\boldsymbol{\eta}(t)$.

Rezultat (1.55) možemo dobiti bez da koristimo Fokker-Planck jednađbu, direktno iz formule za lančano deriviranje stohastičke varijable u Ito interpretaciji. Taj izraz se zove Ito lema, a ovdje ćemo dati skicu izvoda za jednodimenzionalnu varijablu. Sjetimo se da pravilo lančane derivacije možemo shvatiti kao razvoj u Taylorov red. Ako je zadana jednađba $dx = vdt$, a treba dobiti jednađbu za neku drugu varijablu $y = f(x)$, možemo prvo napisati razvoj

$$dy = \frac{\partial f}{\partial x} dx + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} (dx)^2 + \dots \quad (1.56)$$

Zatim koristimo $dx = vdt$ i $(dx)^2 = v^2(dt)^2$, te zbog $(dt)^2 = 0$ zadržavamo samo prvi član u razvoju i dobivamo pravilo za lančano deriviranje. Pogledajmo sada što se dogodi ako je varijabla $x(t)$ stohastička i dana Ito jednađbom $dx = vdt + BdW$. Uvrštavanjem u jednađbu (1.56) dobivamo osim člana s $(dt)^2$ i članove s $dtdW$ i $(dW)^2$. Prva dva viša člana ponovno zanemarujemo, ali znamo da je očekivanje kvadrata Wienerovog pomaka jednak razlici vremena, $E[(\Delta W)^2] = \Delta t$, pa taj član ne smijemo zanemariti. Prelaskom iz razlike u diferencijal, može se pokazati (za detaljan izvod vidi npr. (Øksendal, 2003)) da vrijedi jednakost $(dW)^2 = dt$. Uvrštavanjem dobivamo Ito lemu,

$$dy = \left(\frac{\partial f}{\partial x} v + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} B^2 \right) dt + \frac{\partial f}{\partial x} BdW. \quad (1.57)$$

Da je jednađba dana u Stratonovich interpretaciji, tada bi se transformacija koordinata radila kao da se radi o običnoj diferencijalnoj jednađbi, odnosno, imali bi

$$dy = \frac{\partial f}{\partial x} v dt + \frac{\partial f}{\partial x} B dW. \quad (1.58)$$

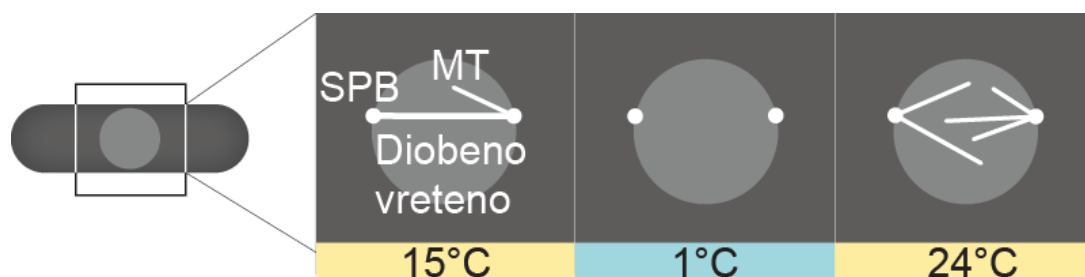
Razliku između interpretacija čini drugi član u zagradi u jednažbi (1.57), koji u više dimenzija vodi na jednažbu (1.55).

2 Rezultati

2.1 Formiranje diobenog vretena opaženo svjetlosnim mikroskopom

2.1.1 Eksperimentalni postav

Za vrijeme mitoze u kvascu *S. pombe*, polovi diobenog vretena su integrirani u jezgrinu ovojnicu, koje se ne raspada, i iz njih rastu mikrotubuli prema unutrašnjosti jezgre koji formiraju diobeno vreteno. Diobeno vreteno čine paralelni (McDonald et al., 1992) i antiparalelni svežnjevi mikrotubula (Mastronarde et al., 1993a; Pavin i Tolic, 2016). Stoga da bi razumjeli način na koji se formira diobeno vreteno moramo istražiti kako se formiraju svežnjevi mikrotubula. Na početku mitoze, polovi su blizu jedan drugom, te kako mikrotubuli rastu, razdvajaju polove i diobeno vreteno raste. Zbog toga što se većina svežnjeva formira kad su polovi blizu jedan drugom, nije moguće promatrati nastajanje pojedinačnih svežnjeva bez perturbacije sustava. Kako bismo mogli opaziti nastajanje svežnjeva svjetlosnim mikroskopom, koristimo eksperimentalni postav, do sada korišten za proučavanje procesa uhvata kinetohora (Kalinina et al., 2013), u kojem već formirano vreteno naglo smrzavamo. Eksperimentalna procedura prikazana je shematski na slici 2.1.

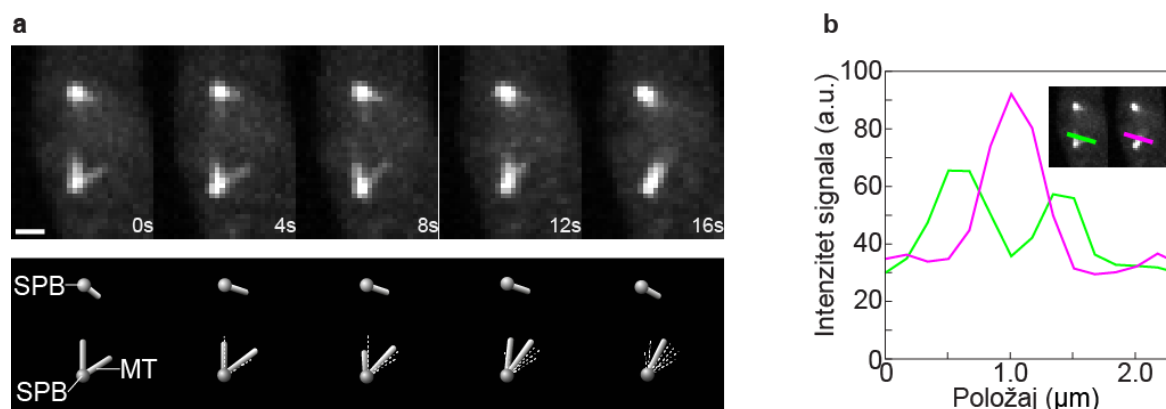


Slika 2.1. Eksperimentalni postav za proučavanja sastavljanja diobenog vretena u kvascu. Lijevo je shematski prikaz stanice. Desno su sheme jezgre na različitim temperaturama. Bijele linije su mikrotubuli (MT) koji rastu iz polova koji su prikazani bijelim krugovima (SPB) i čine diobeno vreteno.

Smrzavanjem stanice se mikrotubuli u diobenom vretenu depolimeriziraju, dok polovi ostaju nepomični. Nakon toga se uzorak zagrijava natrag na sobnu temperaturu, te ponovno počinje polimerizacija mikrotubula. Novonastali mikrotubuli ponovno tvore svežnjeve, ali ovaj put ti mikrotubuli imaju duljine u mikronima, pa se mogu razlučiti svjetlosnim mikroskopom.

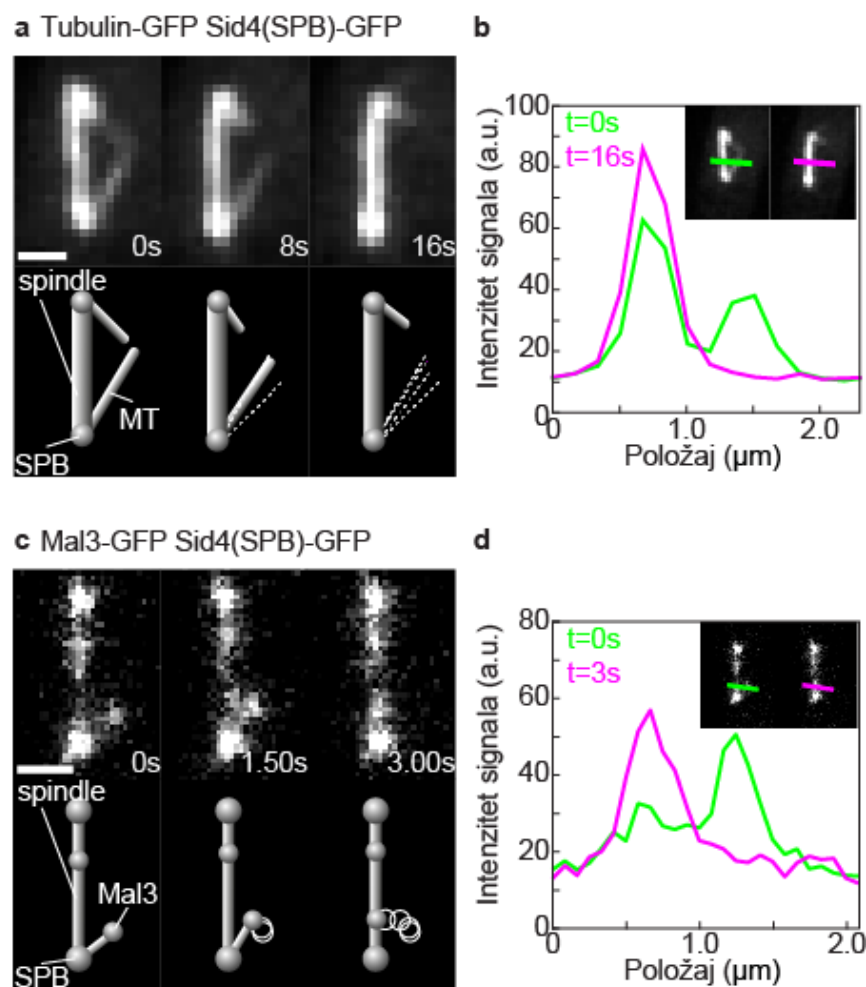
2.1.2 Nastajanje paralelnih svežnjeva

Mikrotubuli koji rastu iz istog pola mogu tvoriti paralelni svežanj na dva različita načina. Prvi način je prikazan na slici 2.2a, na kojoj se nalaze vremenski isječci snimki jezgre kvasca nakon tretmana zamrzavanjem, u kojima su fluorescentnim proteinom označeni mikrotubuli i polovi. U tim se isječcima vidi kako se slobodni mikrotubuli (ili mali svežnjevi) nasumično gibaju oko pola, a nakon što se sretnu se spoje i ponašaju kao jedinstveni objekt. Činjenica da se nakon dodira dalje gibaju zajedno je indicacija da se radi o nastajanju svežnja, a to smo i provjerili tako što smo mjerili intenzitet signala prije i poslije njihovog dodira (slika 2.2b). Intenzitet u novonastalom objektu je približno jednak zbroju intenziteta individualnih objekata, što znači da je zaista došlo do spajanja u svežanj, a ne jednostavno do depolimerizacije mikrotubula.



Slika 2.2. Dva slobodna mikrotubula se vežu u svežanj. **(a)** Nastajanje svežnja u stanicama s označenim tubulinom. **(b)** Profil intenziteta intenziteta (u proizvoljnim jedinicama; a.u. od engl. arbitrary units) prije i poslije nastajanja svežnja u stanicama iz (a).

Drugi način na koji mogu nastati paralelni svežnjevi je ako se slobodni mikrotubul (ili mali svežanj mikrotubula) inkorporira u već nastalo diobeno vreteno. Primjer tog procesa prikazan je na slici 2.3a, zajedno sa provjerom intenziteta (slika 2.3b).



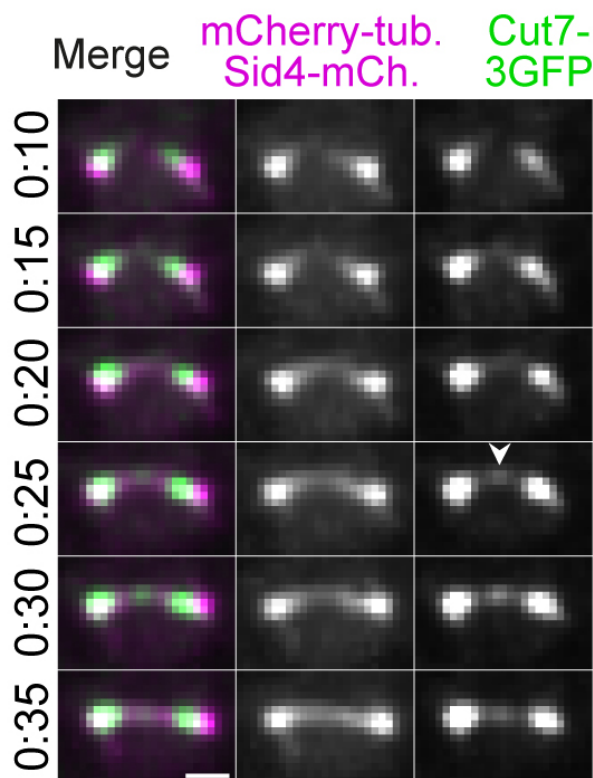
Slika 2.3: Slobodni mikrotubul se integrira u postojeće diobeno vreteno. **(a)** Integracija mikrotubula u diobeno vreteno u stanicama s označenim tubulinom. **(b)** Profil prije i poslje nastajanja svežnja u stanici iz **(a)**. **(c)** Integracija mikrotubula u diobeno vreteno u stanicama s označenim proteinom Mal3 koji se nalazi na vrhovima rastućih mikrotubula. **(d)** Profil intenziteta prije i poslije nastajanja svežnja u stanici iz **(c)**.

Ipak, u ovom slučaju samo činjenica da se intenzitet u diobenom vretenu povećao nije dovoljan dokaz da se radi o formiranju svežnja, jer diobeno vreteno često sadrži mnogo mikrotubula. To znači ne samo da je intenzitet veći, a time i mogućnost krive interpretacije, nego i da i dinamika takvog mnoštva mikrotubula može značajno promijeniti stanje sustava u 2 sekunde koliko prođe između snimki. Zbog tih razloga smo napravili dodatnu provjeru snimajući stanice u kojima je označen Mal3, protein koji se nalazi na vrhovima rastućih mikrotubula (slika 2.3c,d). Također, vrijeme između snimki je smanjeno na 0.75 sekundi kako bi se vidio cijeli proces nastajanja svežnja, a ne samo stanje prije i poslije. Na tim snimkama je jasno vidljivo da se

zaista radi o brzjoj, ali kontinuiranoj inkorporaciji mikrotubula u diobenog vretena, a ne samo o polimerizaciji i depolimerizaciji.

2.1.3 Nastajanje antiparalelnih svežnjeva i akumulacija molekularnih motora

Mikrotubuli (ili mali svežnjevi) koji rastu iz različitih polova diobenog vretena mogu se međusobno povezati i postepeno orijentirati u suprotnim smjerovima, te tako tvoriti samo diobenog vretena. U tom slučaju, radi se o nastajanju antiparalelnih svežnjeva. I te smo procese promatrali snimanjem stanica nakon tretmana smrzavanjem u kojima su označeni mikrotubuli i polovi. Nastajanje antiparalelnih svežnjeva mnogo je lakše prepoznati, jer proces dulje traje, a konačni rezultat je nastajanje diobenog vretena gdje ga prije nije bilo. S obzirom da je gibanje mikrotubula prema antiparalelnoj konfiguraciji nakon početnog kontakta kontinuirano i usmjereno, logično je pretpostaviti da ono nastaje po utjecajem molekularnih motora. Zbog toga smo snimili stanice u kojima su ljubičastom bojom označeni mikrotubuli, a zelenom motorni protein Cut7 (bijela boja dolazi od preklapanja zelene i ružičaste boje), a vremenski isječci takve snimke prikazani su na slici 2.4. Na prva tri vremenska isječka možemo primijetiti mikrotubule koji rastu iz polova diobenog vretena te motorne proteine koji su smješteni blizu polova. Mikrotubuli pivotiraju, te kad dođu blizu jedan drugome možemo primijetiti pojavu signala motora na mjestu preklopa mikrotubula (bijela strelica na slici 2.4). Signal motora na preklopu se zatim polako širi duž mikrotubula kako se oni približavaju antiparalelnoj konfiguraciji. Na kraju vidimo antiparalelnu organizaciju mikrotubula te formiranje diobenog vretena. na mikrotubulima se pojavi na njihovom preklopu u trenutku kad se mikrotubuli dotaknu, te se polako “razmazuje” duž mikrotubula kako se oni približavaju antiparalelnoj konfiguraciji.

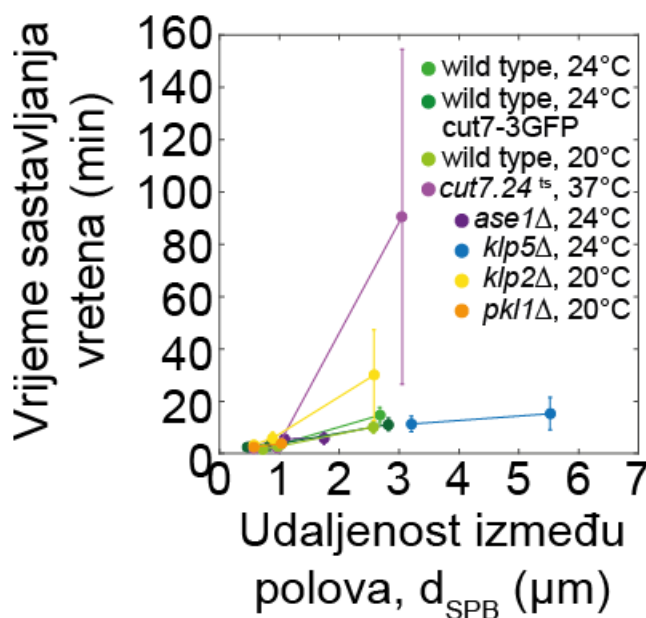


Slika 2.4: Formiranje antiparalelnih svežnjeva. Prikaz vremenskih isječaka snimljenih svjetlosnim mikroskopom, u kojima se vidi proces formiranja antiparalelnih svežnjeva u stanicama kvasca *S. pombe*. U prvom stupcu su prikazana oba kanala zajedno (engl. merge), s tim da su mikrotubuli prikazani ljubičastom bojom, a molekularni motori (Cut7) zelenom bojom. Druga dva stupca prikazuju zasebno redom mikrotubule i motore. Vrijeme je min:s, a bijela linija je 1 μm . Strelica u trećem stupcu prikazuje pojavu signala motora u točki gdje se mikrotubuli dodiruju.

2.1.4 Perturbacije ekspresije motornih i vezivnih proteina

S obzirom da postoje dobre indikacije da su motorni i vezivni proteini na mikrotubulima zaslužni za njihovo spajanje i orijentiranje u svežnjeve (Fu et al., 2009; Hepperla et al., 2014), napravili smo seriju eksperimenata u kojima smo onemogućili ekspresiju pojedinog proteina te promatrali kako se odvija popravak diobenog vretena nakon smrzavanja. Kao usporedbu koristimo podatke o brzini popravka diobenog vretena u neperturbiranim stanicama, koji su prikazani na slici 2.5. Mnogi proteini, osim što vežu mikrotubule, reguliraju njihovu dinamiku, tj. rast i skraćivanje, pa je njihova eliminacija promijenila očekivanu duljinu diobenog vretena, ali ne i brzinu njegovog popravka. Jedini protein koji se nije mogao eliminirati genetskom modifikacijom je Cut7, jer se stanice bez tog proteina ne mogu dijeliti. Umjesto potpune eliminacije, stanice su modificirane da eksprimiraju Cut7 koji je osjetljiv na temperaturu, te prestane djelovati kad se postigne temperatura od

37°, što se dogodi nakon oko 3 minute. Na slici 2.5 prikazani su, zajedno sa neperturbiranim stanicama, svi mutanti koji su analizirani, te vrijeme potrebno svakoj stanici da popravi diobeno vreteno nakon smrzavanja u ovisnosti o razmaku između polova. Ti podaci će se koristiti za provjeru predviđanja koja daju teorijski modeli.

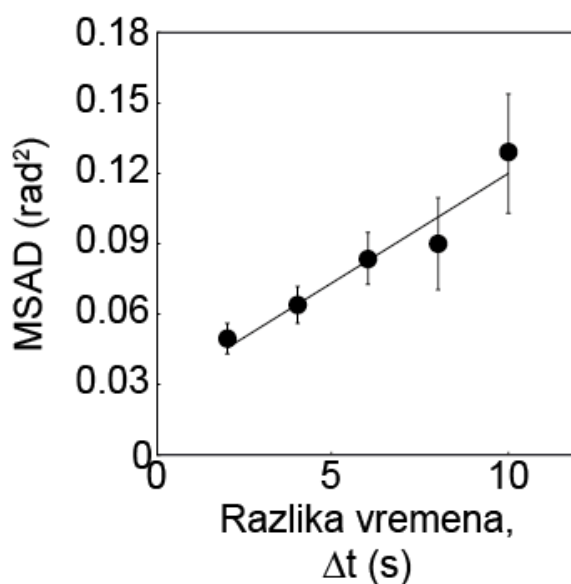


Slika 2.5 Vrijeme popravka diobenog vretena u ovisnosti o udaljenosti između polova za mutante kojima su eliminirani različiti vezivni proteini.

2.1.5 Nasumično kutno gibanje mikrotubula

Od prije je poznato da mikrotubuli ili svežnjevi mikrotubula koji su jednim krajem spojeni na pol diobenog vretena vrše nasumično rotacijsko gibanje kao da su zglobovno vezani za njega. Za ovo nasumično gibanje je pokazano da nije posljedica aktivnih procesa u stanici nego termalnih fluktuacija, odnosno Brownovsko (Kalinina et al., 2013). S obzirom da su molekularni motori mali u odnosu na mikrotubule, oni se vežu samo na mikrotubule koji su međusobno blizu. Zbog toga je upravo njihovo nasumično gibanje nužno kako bi se dva mikrotubula međusobno približili kako bi mogli formirati svežanj. Kako bi se nasumično rotacijsko gibanje mikrotubula moglo kvantificirati, potrebno je znati koeficijent kutne difuzije. Postoji nekoliko teorijskih radova u kojima su razvijeni modeli za računanje koeficijenta kutne difuzije za ravne, tanke štapove, koji su dobra aproksimacija mikrotubula, i svi ukazuju na to da je on obrnuto proporcionalan s trećom potencijom duljine tog štapa, $D \propto R^{-3}$ (Tirado i de la Torre, 1980). Međutim, konstanta proporcionalnosti ovisi o viskoznosti medija,

koji je teško precizno mjeriti kad se radi o nukleoplazmi žive stanice. U ovom radu ćemo se, kadgod je moguće, oslanjati na direktna mjerenja koeficijenta kutne difuzije iz naših eksperimenata, koristeći izraz $\langle \Delta\theta^2 \rangle = 2D\Delta t$ (porijeklo ovog izraza objašnjeno je u poglavlju 1.2.8). Ovisnost kvadrata pomaka o vremenu je prikazano na slici 2.6. Vidimo da je ovisnost zaista linearna, odnosno da je gibanje difuzijsko, te ćemo konstantu difuzije mjeriti iz takvih grafova metodom najmanjih kvadrata.



Slika 2.6. Srednji kvadrat kutnog pomaka (engl. mean square angular displacement; MSAD) u ovisnosti o razlici vremena (točke), te pravac koji najbolje opisuje te podatke (linija). Margine predstavljaju standardnu pogrešku.

2.2 Modeliranje mikrotubula i vezivnih proteina

2.2.1 Pivotiranje mikrotubula oko polova

U našim modelima, mikrotubule zamišljamo kao tanke, ravne štapove koji su jednim krajem prikvačeni za pol, koji se modelira kao točka oko koje mikrotubul može slobodno rotirati u svim smjerovima. Zbog velike gustoće nukleoplazme u kojoj se diobeno vreteno nalazi, pretpostavljamo da je naš sustav u režimu jakog gušenja, odnosno da možemo zanemariti inercijske članove u jednadžbi gibanja. S obzirom da jedan kraj mikrotubula uvijek ostaje na polu, jedinični vektor koji se proteže iz pola u smjeru mikrotubula, \hat{r} , u potpunosti opisuje stanje mikrotubula. Na ovaj način se jednadžba gibanja mikrotubula koji nasumično rotira oko pola svodi na Langevinovu jednadžbu za Brownovu česticu koja se giba po površini jedinične sfere. Konačni rezultat se može dobiti direktnom primjenom Ito leme, vidi na primjer (Øksendal,

2003), no ovdje ćemo se poslužiti konceptima diskutiranim u poglavlju 1.2 kako bi se zadržalo što više fizikalne intuicije. Započet ćemo tako da jednadžbu (1.26) zapišemo u 3D, i ponovno pretpostavimo da se nalazimo u režimu jakog gušenja,

$$0 = \mathbf{F} - \gamma \mathbf{v} + \mathbf{L}(t). \quad (2.1)$$

Kako bismo dobili jednadžbu za Brownovo gibanje po jediničnoj sferi, cijelu jednadžbu vektorski množimo jediničnim vektorom položaja, te dobivamo

$$\boldsymbol{\omega} = \frac{D}{k_B T} \boldsymbol{\tau} + \sqrt{2D} (\hat{\mathbf{r}} \times \boldsymbol{\eta}(t)). \quad (2.2)$$

Ovdje $\boldsymbol{\omega} = \hat{\mathbf{r}} \times \mathbf{v}$ i $\boldsymbol{\tau} = \hat{\mathbf{r}} \times \mathbf{F}$ predstavljaju kutnu brzinu i moment sile za česticu na jediničnoj sferi, a s obzirom da se radi o Brownovoj čestici, koristili smo poznati rezultat za intenzitet šuma. Jedinični vektor položaja može, po definiciji, mijenjati orijentaciju, ali ne i normu, pa mora vrijediti

$$\frac{d\hat{\mathbf{r}}}{dt} = \boldsymbol{\omega} \times \hat{\mathbf{r}}, \quad (2.3)$$

Naš je cilj kombinirati jednadžbe (2.2) i (2.3), te zatim transformacijom koordinatama dobiti jednadžbe gibanja u sfernim koordinatama. Kako bi račun bio kompaktniji, koristimo matričnu notaciju. Vektorski produkt može se napisati kao produkt antisimetrične matrice i vektora. Na primjer, za vektorski produkt općenitih Kartezijevih vektora $\mathbf{a} = (a_x, a_y, a_z)$ i $\mathbf{b} = (b_x, b_y, b_z)$ vrijedi:

$$\mathbf{a} \times \mathbf{b} = [\mathbf{a}_\times] \mathbf{b} = [\mathbf{a}_\times]^T \mathbf{a}, \quad (2.4)$$

gdje je

$$[\mathbf{a}_\times] = \begin{bmatrix} 0 & -a_z & a_y \\ a_z & 0 & -a_x \\ -a_y & a_x & 0 \end{bmatrix}. \quad (2.5)$$

Jednadžba gibanja za vektor položaja u Kartezijevim koordinatama glasi:

$$\dot{\hat{\mathbf{r}}} = \frac{D}{k_B T} [\hat{\mathbf{r}}_\times]^T \boldsymbol{\tau} + \sqrt{2D} [\hat{\mathbf{r}}_\times]^T [\hat{\mathbf{r}}_\times] \boldsymbol{\eta}(t). \quad (2.6)$$

Ovdje su komponente šuma $\boldsymbol{\eta} = (\eta_x, \eta_y, \eta_z)$, a vektor položaja se može parametrizirati preko polarnog kuta, θ , i azimutalnog kuta, φ ,

$$\begin{bmatrix} \hat{r}_x \\ \hat{r}_y \\ \hat{r}_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sin \theta \cos \varphi \\ \sin \theta \sin \varphi \\ \cos \theta \end{bmatrix}. \quad (2.7)$$

Deriviranjem dobivamo

$$\begin{bmatrix} \dot{\hat{r}}_x \\ \dot{\hat{r}}_y \\ \dot{\hat{r}}_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta \cos \varphi \dot{\theta} - \sin \theta \sin \varphi \dot{\varphi} \\ \cos \theta \sin \varphi \dot{\theta} + \sin \theta \cos \varphi \dot{\varphi} \\ \sin \theta \dot{\theta} \end{bmatrix}. \quad (2.8)$$

Jednadžbe gibanja za kutove dobivaju se transformacijom Kartezijevih koordinata u sferne koordinate. Matrica transformacije je:

$$\mathcal{R} = \begin{bmatrix} \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \\ \cos \theta \cos \varphi & \cos \theta \sin \varphi & -\sin \theta \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \end{bmatrix}. \quad (2.9)$$

Množenjem svih članova u jednadžbi (2.6) s lijeva matricom transformacije dobivamo

$$\begin{bmatrix} \dot{\theta} \\ \dot{\varphi} \end{bmatrix} = \frac{D}{k_B T} \mathcal{R}([\hat{\mathbf{r}}_\times]^T \boldsymbol{\tau}) + \sqrt{2D} \begin{bmatrix} \cos \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & -\sin \theta \\ -\sin \varphi / \sin \theta & \cos \varphi / \sin \theta & 0 \end{bmatrix} \circ \boldsymbol{\eta}. \quad (2.10)$$

U sfernim koordinatama komponente šuma više nisu konstantne, pa ova jednadžba ima Stratonovich interpretaciju. Da bismo dobili Ito interpretaciju te jednadžbe, koristimo jednadžbu (1.55), a stupci matrice koja množi šum su:

$$\begin{aligned} V_x &= \sqrt{2D} \begin{bmatrix} \cos \theta \cos \varphi \\ -\sin \varphi / \sin \theta \end{bmatrix}, \\ V_y &= \sqrt{2D} \begin{bmatrix} \sin \theta \sin \varphi \\ \cos \varphi / \sin \theta \end{bmatrix}, \quad V_z = \sqrt{2D} \begin{bmatrix} -\sin \theta \\ 0 \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (2.11)$$

Jednadžba gibanja za kutove u Ito interpretaciji glasi

$$\begin{bmatrix} \dot{\theta} \\ \dot{\varphi} \end{bmatrix} = D \left(\frac{\mathcal{R}([\hat{\mathbf{r}}_\times]^T \boldsymbol{\tau})}{k_B T} + \begin{bmatrix} \cot \theta \\ 0 \end{bmatrix} \right) + \sqrt{2D} \begin{bmatrix} \eta_\theta \\ \eta_\varphi / \sin \theta \end{bmatrix}, \quad (2.12)$$

gdje se, zbog transformacija, pojavio spuriozni drift $D \cot \theta$. Ovdje smo zbrojili varijance svih šumova po θ i po φ koordinati, a lako je pokazati da su nove komponente šuma,

$$\begin{aligned} \eta_\theta &= \cos \theta \cos \varphi \eta_x + \sin \theta \sin \varphi \eta_y - \sin \theta \eta_z, \\ \eta_\varphi &= -\sin \varphi \eta_x + \cos \varphi \eta_y, \end{aligned} \quad (2.13)$$

međusobno nezavisne, to jest $\langle \eta_i(t), \eta_j(t') \rangle = \delta_{ij}$, za $i, j = \theta, \varphi$. Na kraju treba napomenuti da, iako smo ove jednadžbe izvodili pod pretpostavkom da se radi o

čestici koja se giba po površini sfere, jednadžba (2.12) ne sadrži moment inercije, tako može općenito opisivati orijentaciju nekog tijela u režimu jakog gušenja.

2.2.2 Modeliranje sila kojima djeluju vezivni proteini

U našem modelu, usmjereno gibanje mikrotubula prema paralelnoj ili antiparalelnoj konfiguraciji uzrokovano je silama koje proizvode vezivni proteini spojeni na dva mikrotubula odjednom. Vezivni protein modeliramo kao Hookeovsku oprugu, te on djeluje na mikrotubule na koje je vezan silom

$$\mathbf{f} = -k(\mathbf{y} - y_0\hat{\mathbf{y}}), \quad (2.14)$$

gdje je \mathbf{y} vektor istegnuća vezivnog proteina, $\hat{\mathbf{y}}$ je njegov smjer, k je konstanta opruge, a y_0 duljina opruge (vezivnog proteina) u opuštenom stanju. Kraj vezivnog proteina vezan koji je za mikrotubul može se pomicati duž mikrotubula tako da se njegove glave naizmjenice odvezuju i ponovno vežu na mikrotubul (detaljan opis tog mehanizma u poglavlju 1.1.3). S obzirom da sa odvezana glava ne mora nužno vezati natrag na isto mjesto na mikrotubulu, efektivno dolazi do pomicanja cijelog vezivnog proteina. To pomicanje duž mikrotubula može se opisati jednadžbom gibanja, odnosno Langevinovom jednadžbom za neku koordinatu x koja predstavlja položaj motora duž mikrotubula na koji je vezan.

U slučaju da se radi o motoru, to pomicanje ima preferirani smjer u odnosu na polarnost mikrotubula. Poznato je da brzina kojom motori koračaju po mikrotubulu, $v_x = dx/dt$, opada sa silom koja se protivi njihovom kretanju (Kolomeisky i Fisher, 2007; Svoboda i Block, 1994). Odnos između brzine i sile je u stvarnosti nelinearan, ali se može uspješno aproksimirati linernom funkcijom. Osim determinističkog člana koji ovisi o sili, brzina motora ima i stohastičku komponentu jer se promjene konformacije motora koje dovode do njegovog pomicanja događaju nasumično. Ako uzmemo ova dva doprinosa u obzir, dobivamo empirijsku jednadžbu gibanja

$$v_x(t) = v_0 \left[1 - \frac{\mathbf{f} \cdot \hat{\mathbf{x}}}{f_0} \right] + \sqrt{2D_v}\eta_x(t), \quad (2.15)$$

gdje je v_0 brzina gibanja motora u odsustvu sile, f_0 sila potrebna da se motor zaustavi, a D_v mjera varijabilnosti u brzini njegovog kretanja koja ima dimenziju difuzijske konstante. Skalarni produkt $\mathbf{f} \cdot \hat{\mathbf{x}}$ se pojavljuje zato jer samo komponenta sile u smjeru mikrotubula, $\hat{\mathbf{x}}$, utječe na gibanje motora. Brzina motora i sila zaustavljanja (engl. *stall force*) se mogu mjeriti u eksperimentima s laserskom stupicom (Svoboda i

Block, 1994), što je i načinjeno za većinu motornih proteina, uključujući i kinezin-5 koji je nama od interesa (Edamatsu, 2014; Fallesen et al., 2017). Varijabilnost brzine se procjenjuje iz modela mehanizma njegovog gibanja, $D_c = rv_0d/2$, gdje je d duljina jednog koraka, a r mjerena varijanca koračanja (Kolomeisky i Fisher, 2007).

U slučaju da se radi o pasivnom vezivnom proteinu, njegovo gibanje duž mikrotubula nema preferirani smjer. Međutim, njegove glave se i dalje nasumično odvajaju i vraćaju na mikrotubul što efektivno dovodi do njegovog pomicanja, kao i kod motora. Zbog toga se pasivni vezivni protein ponaša kao čestica koja se giba difuzivno u jednoj dimenziji pod utjecajem vanjske sile (vidi poglavlje 1.2.8). Njegove glave su i dalje, u odnosu na vanjske sile, relativno jako vezane na mikrotubul, pa gibanje vezivnog proteina možemo modelirati kao da je u režimu jakog gušenja. U tom slučaju, kao i u dosadašnjim primjerima, ukupna sila koja djeluje na njega balansirana je trenjem, iz čega se dobiva jednadžba gibanja

$$v_x(t) = D_c \frac{\mathbf{f} \cdot \hat{\mathbf{x}}}{k_B T} + \sqrt{2D_c} \eta_x(t), \quad (2.16)$$

a u ovom slučaju D_c ima zaista značenje difuzijskog koeficijenta, te se računa iz faktora trenja vezivnog proteina po mikrotubulu koristeći Einsteinovu relaciju $D = k_B T / \gamma$.

2.2.3 Vezanje i odvezivanje vezivnih proteina

Vezivni protein se općenito mogu nalaziti slobodni u nukleoplazmi, imati jedan kraj spojen za mikrotubul, ili biti vezani svakim krajem na drugi mikrotubul i djelovati silom na njih. Vezanje i odvezivanje vezivnih proteina se događa nasumično, te se modelira kao diskretan Markovljev proces s kontinuiranim vremenom. U najopćenitijem modelu, prostor stanja vezivnog proteina je $\{0, 1, 2\}$, što predstavlja redom potpuno slobodni vezivni protein, vezivni protein kojem je jedan kraj spojen za mikrotubul, te vezivni protein kojem su oba kraja spojena, svaki za drugi mikrotubul. Kao što smo opisali u poglavlju 1.2.3, kako bismo konstruirali proces s kontinuiranim vremenom, prvo ćemo vrijeme rastaviti na male intervale Δt , te napisati matricu prijelaza između stanja, $[P(\Delta t)]$. Uvest ćemo stope prijelaza, $k_{\beta\alpha}$, tako da vjerojatnost da se protein nakon Δt nađe u stanju β , ako je na početku intervala bio u stanju α , iznosi $P(\beta|\alpha) = k_{\beta\alpha}\Delta t$, pod uvjetom da vrijedi $\beta \neq \alpha$. S obzirom da je vremenski interval malen, zanemarit ćemo višestruke prijelaze, $k_{02} = k_{20} = 0$. Konačno,

vjerojatnost da vezivni protein ostane u istom sanju kao i na početku intervala je $P(\alpha|\alpha) = 1 - \sum_{i \neq \alpha} k_{i\alpha} \Delta t$. Na ovaj način smo definirali sve elemente matrice prijelaza, koja iznosi

$$[P(\Delta t)] = \begin{bmatrix} 1 - k_{10} & k_{01} & 0 \\ k_{10} & 1 - k_{01} - k_{21} & k_{12} \\ 0 & k_{21} & 1 - k_{21} \end{bmatrix} \Delta t. \quad (2.17)$$

Koristeći ovaj izraz i jednadžbu (1.7) možemo napisati i Master jednadžu, odnosno sustav diferencijalnih jednadžbi za vjerojatnosti da se vezivni protein nađe u svakom od mogućih stanja,

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_0}{\partial t} &= k_{01}P_1 - k_{10}P_0, \\ \frac{\partial P_1}{\partial t} &= k_{10}P_0 + k_{12}P_2 - (k_{01} + k_{21})P_1, \\ \frac{\partial P_2}{\partial t} &= k_{21}P_1 - k_{12}P_2. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Za razliku od slučajeva koje smo do sad proučavali, kao što je Piossonov proces, ovdje stope nisu nužno konstantne u vremenu. Promotrimo, na primjer k_{12} , što predstavlja stopu kojom se jedan kraj vezivnog proteina odvaja od mikrotubula. Ako promatramo jedan kraj proteina vezanog za mikrotubul na mikroskopskoj razini, njihovu interakciju zamišljamo kao potencijalnu jamu na malim udaljenostima, reda veličine nekoliko $k_B T$, koja predstavlja vezano stanje. Kako bi se njihova veza raspala, nasimučne termalne fluktuacije glave vezivnog proteina moraju prevladati privlačni potencijal koji ju drži spojenu. Međutim, ako je vezivni protein napet, tada se efektivno smanjuje jačina kemijske veze, jer sada termalne fluktuacije moraju prevladati razliku kemijske energije u vezi i elastične energije opruge. Zalkjučujemo da stopa odvajanja vezivnog proteina kad je vezan na oba mikrotubula mora ovisiti o sili koju vezivni protein osjeća zbog svog rastezanja. Ovakvo ponašanje se u literaturi navodi pod engl. *load-dependent detachment*, te se ovisnost o sili modelira kao eksponencijalna funkcija, $k_{12} \propto \exp(f/f_c)$, gdje je f_c kritična sila odvajanja, a f iznos elastične sile koju osjeća vezivni protein (Kramers, 1940). S druge strane, ako je samo jedan kraj spojen, a drugi slobodan, vezivni protein ne osjeća elastičnu silu, pa je stopa odvajanja konstanta. Krajevi vezivnog proteina su međusobno jednaki, pa nema razloga da stopa odvajanja u slučaju kad je jedan kraj slobodan, k_{01} , bude različita od stope odvajanja jednog kraja u slučaju kad su oba vezana, ali vezivni protein ne osjeća nikakvu silu. Time dobivamo $k_{12} = k_{01} \exp(f/f_c)$. Treba imati na

umu da sila koju vezivni protein osjeća, prema jednadžbi (2.14), ovisi o trenutnom položaju mikrotubula, koji ovisi o svim drugim vezivnim proteinima, jer oni pomiču mikrotubule. Drugim riječima, vezivni proteini nisu u potpunosti nezavisni. Stopa odvezivanja k_{12} nije jedini slučaj gdje se vidi ovakvo ponašanje. Promotrimo sada stopu k_{21} , koja predstavlja vezanje jednog kraja an mikrotubul, ako je drugi već vezan. U našem modelu, kad nije vezan na mikrotubule, vezivni protein se nalazi u relaksiranom stanju, no i dalje osjeća termalne fluktuacije. To znači da je iznos istegnuća vezivnog proteina dan Boltzmannovom respodjelom, $y \sim \mathcal{N}(y_0, \sqrt{k_B T/k})$. Ako je jedan njegov kraj vezan, drugi kraj se može vezati samo na mjestima na mikrotubulu gdje je udaljenost između mikrotubula točno jednaka njegovom trenutačnom istegnuću y . Koristeći isti princip kao i za stopu odvajanja, odnosno činjenicu da nema razlika između krajeva vezivnog proteina, možemo uspostaviti vezu između stope vezanja prvog i drugog kraja, $k_{21} = c_a k_{10}$, gdje je $c_a \in [0,1]$ faktor koji ovisi o trenutnom istegnuću vezivnog proteina i udaljenosti između mikrotubula, a za stopu k_{10} pretpostavljamo da je konstantna. Ako je udaljenost između mikrotubula manja od relaksirane duljine vezivnog proteina, y_0 , tada vrijedi $c_a = 1$ i stope vezanja za oba kraja su jednake. Ako su mikrotubuli toliko međusobno udaljeni da slučajne termalne fluktuacije vezivnog proteina ne mogu dovesti do tolikog istegnuća, tada $c_a \rightarrow 0$ i vjerojatnost vezanja oba kraja za mikrotubul isčezava. Stope vezanja i odvezivanja jednog kraja vezivnog proteina ovise o njegovoj vrsti, te se tipično računa iz prosječnog vremena koje on provodi na mikrotubulu u eksperimentu, vidi npr. (Edamatsu, 2014; Lansky et al., 2015).

U realnom sustavu, na mikrotubule djeluje mnoštvo vezivnih proteina nakupljenih neravnomjerno duž njih, pa ima puno više smisla promatrati njihovu gustoću, a ne vjerojatnosti stanja pojedinačnih vezivnih proteina. Olakotna okolnost je da na gibanje mikrotubula utječu samo vezivni proteini koji su vezani na oba kraja. Njihovu gustoću duž mikrotubula ćemo označiti s $\rho(x, t)$ i računati analogno reakcijsko-difuzijskoj jednadžbi (poglavlje 1.2.7, jedina razlika između gustoće i raspodjele vjerojatnosti je u normalizaciji). Također, stope vezanja i odvezivanja prvog od dva kraja ne ovise o geometriji mikrotubula, pa možemo pretpostaviti da su slobodni vezivni protein i oni koji su vezani jednim krajem u termalnoj ravnoteži, tako da njihove ukupne struje kroz nukleoplazmu, odnosno duž mikortubula isčezava. Također, gustoću vezivnih proteina u nukleoplazmi možemo smatrati konstantnom i

nepromjenjivom, jer je vezivnih proteina u nukleoplazmi toliko da je trenutna prmojena njihove lokalne gustoće zbog vezanja nekih od njih na mikrotubul zanemarive. U tom slučaju, efektivnu gustoća vezivnih proteina koji se mogu spojiti na oba mikrotubula iznosi $k_{10}c_0/k_{01}$, gdje je c_0 linearna koncentracija vezivnih proteina u nukleoplazmi. Sada možemo napisati i diferencijalnu jednadžbu za gustoću vezivnih proteina koji su spojeni na oba mikrotubula,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla J + k_{\text{on}}c_0 - k_{\text{off}}\rho, \quad (2.19)$$

Gdje ∇J predstavlja gradijent struje vezivnih proteina duž mikortubula (vidi poglavlje 1.2.7), a supstitucije $k_{\text{on}} = k_{10}k_{21}/k_{01}$ i $k_{\text{off}} = k_{12}$ smo koristili kako bismo ostali konzistentni s literaturom. Treba imati na umu da i stope i struja ovise o geometriji sustava, tako da se jednadžba (2.19) osim u najjednostavnijim slučajevima ne može analitički riješiti bez korištenja aproksimacija specifičnih za promatrani sustav.

2.2.4 Vrijednosti konstantnih parametara

Kako bi rezultati našeg modela što bolje opisivali procese u živoj stanici, važno je da su vrijednosti konstantnih parametara što bliže stvarnim vrijednostima. U Tablici 1 dan je popis parametara vezanih uz svojstva mikrotubula, vezivnih proteina i stanične jezgre. U nastavku ćemo dati kratki opis kako su te vrijednosti dobivene.

Tablica 1. Parametri korišteni u ovom radu. Ako nije napomenuto drugačije, u tekstu i grafovima se koriste ove vrijednosti.

	Parametar	Vrijednost	Izvor
k	Konstanta opruge	100 pN/ μm	Vrijednost za Eg5 (Johann et al., 2015)
k_a	Stopa spajanja	0.01 s ⁻¹	Vrijednost za Ase1 (Lansky et al., 2015)
k_{d0}	Stopa odvajanja	0.1 s ⁻¹	Vrijednost za Ase1 (Lansky et al., 2015)
f_0	Kritična sila	3 pN	Vrijednost za kinezin-1 (Schnitzer et al., 2000)
y_0	Duljina pasivnih vezivnih proteina	40 nm	Vrijednost za Prc1 (Kellogg et al., 2016; Subramanian et al., 2010)
$y_{0,m}$	Duljina motora	60 nm	Vrijednost za Kinesin-5 (Kashina et al., 1996)
D_0	Difuzijska konstanta pasivnih vezivnih proteina	0.05 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	Vrijednost za Ase1 (Kapitein et al., 2008; Lansky et al., 2015)
v_0	Brzina motora	$\pm 0.01 \mu\text{m/s}$	Vrijednost za Cut7 (Edamatsu, 2014)
D_c	Fluktuacije brzine motora	$5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$	Izračunato iz teorije (Kolomeisky i Fisher, 2007)
f_0	Sila zaustavljanja motora	$\pm 1.5 \text{ pN}$	Vrijednost za cin8 (Fallesen et al., 2017)
$\langle R \rangle$	Očekivana vrijednost duljine mikrotubula	0.8 μm	(Cojoc et al., 2016; Kalinina et al., 2013)
D	Difuzijska konstanta mikrotubula	$0.003 R^{-3} \text{ rad}^2\text{s}^{-1}$	Mjereno ovdje i u (Kalinina et al., 2013)
n_{MT}	Broj mikrotubula	10	Mjereno
R_C	Polumjer jezgre	1.5 μm	(Kalinina et al., 2013; Neumann i Nurse, 2007)
d_{SPB}	Udaljenost između polova	0.5 – 2.5 μm	Mjereno

Za modeliranje dinamike vezivnih proteina koristit ćemo uglavnom rezultate in vitro eksperimentata jer, zbog velike kompleksnosti žive stanice, često nije moguće vršiti precizna in vivo mjerenja parametara svojstvenih pojedinačnim proteinima. Za vrijednost konstante opruge za sve vrste vezivnih proteina uzimamo $k = 100 \text{ pN}/\mu\text{m}$, što odgovara vrijednosti za Eg5 mjerenoj u (Valentine et al., 2006), i također korištenoj u drigim teorijskim radovima (Johann et al., 2015), a ona je tri puta manja nego vrijednost izmjerena u (Kawaguchi i Ishiwata, 2001). Za stope spajanja i odvajanja vezivnih proteina koristimo vrijednosti $k_{\text{on}} = 0.01 \text{ s}^{-1}$ i $k_{\text{off}} = 0.1 \text{ s}^{-1}$, što odgovara vrijednostima dobivenim za pasivni vezivni protein Ase1 (ref. (Lansky et

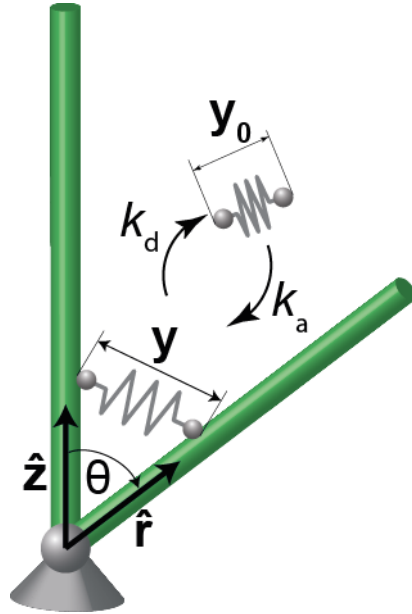
al., 2015)), a slična vrijednost za stopu odvajanja se dobiva iz vremena koje motor Cin8 provodi na mikrotubulu (Roostalu et al., 2011). Odvajanje vezivnog proteina od mikrotubula je također karakterizirano kritičnom silom potrebnom da se razbije njihova veza, a tu silu koristimo vrijednost $f_c = 1.5$ pN, koja je izmjerena za kinezin-1 (Schnitzer et al., 2000). Duljine vezivnih proteina se razlikuju ovisno o njihovom tipu jer je pasivni vezivni protein Ase1, koji je jedini takve vrste u kvascu, kraći nego kinezini koji su glavni motori koji sudjeluju u procesima koje ovdje opisujemo. Vrijednosti $y_0 = 40$ nm i $y_{0,m} = 60$ nm, su procijenjene iz slika dobivenih elektronskim mikroskopom za redom Prc1 (Kellogg et al., 2016; Subramanian et al., 2010) (homolog proteina Ase1 u stanicama sisavaca) i Kinesin-5 (Kashina et al., 1996). Pasivni vezivni proteini vrše Brownovo gibanje duž mikrotubula, a difuzijska konstanta tog gibanja za Ase1 iznosi $D_m = 0.05 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Kapitein et al., 2008; Lansky et al., 2015). Kretanje motora karakterizira brzina bez opterećenja $v_0 = \pm 0.01 \mu\text{m/s}$, koja je procijenjena iz naših eksperimenata i slaže se s in vitro mjerenjima za Cut7 (Edamatsu, 2014). S obzirom da je njihovo kretanje stohastičko, njihova brzina ima varijancu $D_m = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, koju smo procijenili iz teorijskog modela (vidi poglavje 2.1.5 i (Kolomeisky i Fisher, 2007)). Osim brzinom, kretanje motora je karakterizirano silom potrebnom da ga se zaustavi, $f_0 = \pm 1.5$ pN, što je vrijednost izmjerena za motor Cin8 u pivskom kvascu (Fallesen et al., 2017), a slična vrijednost je dobivena i za kinezin-5 u žabi *Xenopus* (Shimamoto et al., 2015). Mikrotubuli se oko polova gibaju kutnim Brownovim gibanjem čija difuzijska konstanta ovisi o njihovoj duljini kao $D \propto R^{-3}$ (Tirado i de la Torre, 1979), a konstanta proporcionalnosti dobivena u našim eksperimentima je u skladu s prijašnjim mjerenjima na istom sustavu (Kalinina et al., 2013). Zbog jednostavnosti ćemo u našim modelima pretpostaviti da mikrotubuli imaju konstantnu duljinu, što je dobra aproksimacija s obzirom da je dinamika njihovog rasta i skraćivanja značajno sporija nego njihovo kutno gibanje (Kalinina et al., 2013). Kako bismo uzeli u obzir da njihova duljina ipak varira između mikrotubula, pretpostavit ćemo da njihove duljine poštuju eksponencijalnu raspodjelu s očekivanom vrijednosti $\langle R \rangle = 0.8 \mu\text{m}$. Ta vrijednost je dobivena iz mjerenja u (Cojoc et al., 2016; Kalinina et al., 2013), gdje za je mikrotubule koji su dulji od $0.7 \mu\text{m}$ (kraći mikrotubuli se ne mogu pouzdano izmjeriti iz slika dobivenih svjetlosnim mikroskopom) dobivena očekivana vrijednost $1.5 \mu\text{m}$. Broj mikrotubula u stanici, $n_{\text{MT}} = 10$, i polumjer jezgre $R_C = 1.5 \mu\text{m}$ su

također mjereni u (Kalinina et al., 2013), a polumjer jezgre se poklapa s vrijednosti dobivenoj iz volume jezgre u (Neumann i Nurse, 2007). Konačno, u našim eksperimentima vrijednosti udaljenost između polova se nalazi u rasponu $0.5 < d_{\text{SPB}} < 2.5 \mu\text{m}$.

2.3 Nastajanje paralelnih svežnjeva

2.3.1 Teorijski model za orijentacije mikrotubula

Kako bismo objasnili fizikalne principe koji su zaslužni za nastajanje i stabilnost paralelnih svežnjeva, razvili smo model koji smo nazvali pivotiranje-i-vezanje (engl. pivot-and-bond) (Prelogović et al., 2017), a njegova ilustracija dana je na slici 2.7. On je baziran na eksperimentalnim opservacijama diskutiranim u poglavlju 4, kao i prijašnjim in vivo (Cojoc et al., 2016; Kalinina et al., 2013) i in vitro eksperimentima (Fong et al., 2017), te opisuje interakciju dva mikrotubula koji su zglobovno vezani za isti pol diobenog vretena.



Slika 2.7. Model za nastajanje paralelnih svežnjeva. Mikrotubuli (zeleno) mogu rotirati oko pola diobenog vretena (siva kugla), a na njih djeluju vezivni proteini (sive opruge). Položaji mikrotubula dani su jediničnim vektorima $\hat{\mathbf{r}}$ i $\hat{\mathbf{z}}$, a kut među njima je θ . Vezivni proteini se zakvačuju s obje glave na mikrotubul stopom k_a i otkvačuju stopom k_d , a njihovo istegnuće kad su spojeni je \mathbf{y} . Vezivni proteini imaju opuštenu duljinu y_0 .

Kako bi račun bio jednostavniji, postaviti ćemo koordinatni sustav tako da je jedan od mikrotubula nepomičan u smjeru jediničnog vektora z-osi, $\hat{\mathbf{z}}$, dok je drugi slobodan da se kutno giba oko ishodišta, a orijentacija u vremenu t mu je opisana jediničnim vektorom $\hat{\mathbf{r}}(t)$. Kao što je diskutirano u poglavlju 2.2.1, na mikrotubul djeluju nasumične sile čiji su uzrok termalne fluktuacije u nukleoplazmi. Osim nasumičnog gibanja, na mikrotubul djeluju kratkodosežne sile zbog vezivnih proteina koji se nakupljaju na njemu. U poglavlju 1.6 opisano je kako se modelira orijentacija tijela koje vrši kutno brownovo gibanje. Orijentaciju mikrotubula ćemo parametrizirati preko polarnog i azimutalnog kuta, te koristiti jednadžbu (2.10) kao jednadžbu gibanja za te kutove. Olakotna okolnost u ovom slučaju je da vanjske sile koje uzrokuju proteini vezani na oba mikrotubula djeluju u smjeru mikrotubula, odnosno uvijek prema z-osi, tako da jednadžba gibanja za azimutalni kut ima samo stohastički član. Dapače, zbog simetrije sustava oko z-osi, azimutalni kut ne utječe na to jesu li mikrotubuli spojeni u svežanj ili ne, tako da ga u kontekstu paralelnih svežnjeva možemo u potpunosti ignorirati. Ova činjenica nam dopušta da orijentaciju mikrotubula opišemo jednodimenzionalnom jednadžbom gibanja za azimutalni kut,

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{D}{k_B T} (\tau + k_B T \cot \theta) + \sqrt{2D} \eta_\theta, \quad (3.1)$$

gdje je τ iznos momenta vanjske sile.

Kako bismo izračunali deterministički moment sile koji djeluje na mikrotubul, moramo znati doprinose svih vezivnih proteina koji su svojim krajevima spojeni na oba mikrotubula. Ako po jednu točku na svakom mikrotubulu označimo s $\mathbf{r} = r\hat{\mathbf{r}}$ i $\mathbf{z} = z\hat{\mathbf{z}}$, tad je doprinos ukupnom momentu sile od vezivnih proteina

$$d\boldsymbol{\tau} = \mathbf{r} \times \mathbf{f} dN(r, z, t), \quad (3.2)$$

gdje je dN broj vezivnih proteina koji povezuju elemente mikrotubula $[z, z + dz]$ i $[r, r + dr]$. Vezivne proteina smatramo Hookeovim oprugama, pa je sila kojom oni djeluju $\mathbf{f} = -k(\mathbf{y} - y_0\hat{\mathbf{y}})$. Ovdje je k konstanta opruge, $\mathbf{y} = \mathbf{r} - \mathbf{z}$ je istegnuće proteina koji veže točke \mathbf{r} i \mathbf{z} , s iznosom y i smjerom $\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{y}/y$, a y_0 je duljina vezivnog proteina u opuštenom stanju. Broj spojenih motora može se izraziti preko njihove gustoće, ρ , a te dvije veličine su povezane relacijom $dN(r, z, t) = \rho(r, z, t) dr dz$. Sad možemo izraziti moment sile kojim vezivni protein djeluju na mikrotubule:

$$\boldsymbol{\tau}(t) = k \int_0^R dr \int_0^\infty dz \rho \mathbf{r} \times \mathbf{z} \left(1 - \frac{y_0}{y}\right), \quad (3.3)$$

gdje smo koristili $\mathbf{r} \times (\mathbf{z} - \mathbf{r}) = \mathbf{r} \times \mathbf{z}$ i pretpostavili da se nepomični mikrotubul proteže duž cijele z -osi. Iznos istegnuća možemo zapisati preko koordinata duž mikrotubula i polarnog kuta kao $y(r, z) = \sqrt{r^2 + z^2 - 2rz \cos \theta}$.

Kako bismo odredili moment sile koji djeluje na mikrotubule, potrebno je odrediti gustoću vezivnih proteina, tj. njihovu raspodjelu duž mikrotubula. U aproksimaciji srednjeg polja, gustoća proteina je opisana, po uzoru na jednadžbu (1.25), diferencijalnom jednadžbom

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\frac{\partial j_r}{\partial r} - \frac{\partial j_z}{\partial z} + k_a c(r, z) - k_d(r, z) \rho. \quad (3.4)$$

U ovoj jednadžbi struje predstavljaju redistribuciju vezivnih proteina duž oba mikrotubula, $j_{r,z} = v_{r,z} \rho - D_m \partial_{r,z} \rho$, a D_m je difuzijska konstanta vezivnih proteina koji se miču po mikrotubulima. Zadnja dva člana s desne strane u jednadžbi (3.4) predstavljaju vezanje i odvezivanje proteina, što se događa stopama k_a i k_d , a c je gustoća slobodnih vezivnih proteina. Zbog toga što u našem modelu samo vezivne proteine koji su spojeni svakim krajem na jedan mikrotubul smatramo spojenima (jer

samo oni proizvode silu), pod slobodne vezivne proteina smatramo one koji su već jednim krajem spojeni na jedan od mikrotubula (vidi poglavlje 2.2.3 za diskusiju o procesu spajanja vezivnih proteina na mikrotubule). Međutim ne sudjeluju svi slobodni vezivni protein u svakom trenutku u procesu spajanja zbog toga što, kako bi se drugi kraj vezivnog proteina vezao na mikrotubul, njegovo trenutačno istegnuće mora biti dovoljno da ga dosegne. U našem modelu pretpostavljamo da se slobodni vezivni protein nalaze u termalnoj ravnoteži, odnosno da njihova istegnuća poštuju Boltzmannovu raspodjelu, tako da je gustoća proteina koji se mogu vezati dana s $c = c_0 \sqrt{k/(2\pi k_B T)} \exp[-k(y - y_0)^2/2k_B T]$, gdje je c_0 linearna koncentracija slobodnih vezivnih proteina duž jednog od mikrotubula. Za slobodne vezivne proteine smatramo da čine beskonačan rezervoar, odnosno da se spajanjem jednog od njih njihov broj ne mijenja, pa je njihova koncentracija, c_0 , konstantna, a fizikalna interpretacija te konstante je jednostavno broj slobodnih vezivnih proteina po jedinici diljine mikrotubula. Kako bi ova definicija vrijedila, pojavljuje se faktor $\sqrt{k/(2\pi k_B T)}$, tako da je integral po svim istegnućima $\int_0^\infty c dy = c_0$. Stopa odvezivanja ovisi eksponencijalno o sili koju oseća vezivni protein (Kramers, 1940), $k_d(r, z) = k_{d0} \exp[ky(r, z)/f_c]$, gdje je f_c kritična sila potrebna da bi se prekinula veza između glave proteina i mikrotubula.

Iako nije moguće odrediti gustoću $\rho(r, z)$ bez da definiramo kako se vezivni proteini kreću po mikrotubulima, možemo odrediti ukupni broj vezivnih proteina spojenih na mikrotubula, jer ta vrijednost ne ovisi o njihovom kretanju nakon što su se spojili. Broj vezivnih proteina se dobiva integriranjem jednadžbe (3.4) duž oba mikrotubula, jer u tom slučaju članovi koji sadrže struje vezivnih proteina iščezavaju, te dobivamo

$$\begin{aligned} \frac{\partial N}{\partial t} = & k_a c_0 \sqrt{\frac{k}{2\pi k_B T}} \int_0^R \int_0^\infty \exp\left[\frac{-k(y - y_0)^2}{2k_B T}\right] dr dz \\ & - k_{d0} \int_0^R \int_0^\infty \exp\left[\frac{k(y - y_0)}{f_c}\right] \rho(u, w) dr dz, \end{aligned} \quad (3.5)$$

gdje smo koristili $N = \int_0^R \int_0^\infty \rho(u, w) dr dz$. Od posebne je važnosti za danje račune je broj vezivnih proteina u adijabatskoj aproksimaciji, $\partial \rho / \partial t = 0$ (a time i $\partial N / \partial t = 0$), te uz konstantnu stopu odvezivanja, $k_d(r, z) = k_{d0}$ (detaljna diskusija ovih aproksimacija dana je za slučaj pasivnih vezivnih proteina u poglavlju 2.3.2). U tom

slučaju, posljednji član u jednadžbi (3.5) iznosi $-k_{d0}N$, te preostaje samo izvrjedniti integral Boltzmannovog člana. Može se pokazati da u slučaju kad je kut između mikrotubula dovoljno velik da se vezivni protein ne spajaju blizu vrhova mikrotubula, to jest kad vrijedi $2R \sin \frac{\theta}{2} \gg y_0$, broj vezivnih proteina spojenih na mikrotubule iznosi

$$N(\theta) = \frac{k_a c_0}{k_{d0}} y_0 \frac{\pi - \theta}{\sin \theta}. \quad (3.6)$$

U slučaju kad su mikrotubuli skoro paralelni, vjerojatnost spajanja prvog kraja vezivnog proteina je uniformna duž cijelog mikrotubula duljine R , a raspodjela vjerojatnosti za drugi kraje je Boltzmannova oko te točke, pa je ukupni broj vezivnih proteina $N(\theta \approx 0) = \frac{k_a c_0}{k_{d0}} R$.

2.3.2 *Gustoća pasivnih vezivnih proteina i moment sile koji oni stvaraju*

Kako bismo odredili raspodjelu vezivnih proteina, a time i moment sile koji oni proizvode, potrebno je znati kako se oni kreću po mikrotubulima. Ovdje pretpostavljamo da su vezivni proteini pasivni (za slučaj kad se radi o aktivnim motorima, vidi poglavlje 2.3.6), to jest da njihovo gibanje nije rezultat aktivnih procesa nego samo termalnih fluktuacija. Ova pretpostavka motivirana je do sad objavljenim rezultatima koji pokazuju da je pasivni vezivni protein Ase1 neophodan za ispravno formiranje diobenog vretena u kvascu (Fu et al., 2009; Yamashita et al., 2005). Iako je Ase1 najpoznatiji po povezivanju antiparalelnih mikrotubula, eksperimenti pokazuju da može vezati i mikrotubule koji rastu iz istog pola (Loiodice et al., 2005; Yamashita et al., 2005). Koristeći jednadžbu (2.16), možemo napisati eksplicitne izraze za struje pasivnih vezivnih proteina,

$$j_r = -D_m \left[\frac{k}{k_B T} (r - z \cos \theta) \left(1 - \frac{y_0}{y} \right) + \frac{\partial}{\partial r} \right] \rho, \quad (3.7a)$$

$$j_z = -D_m \left[\frac{k}{k_B T} (z - r \cos \theta) \left(1 - \frac{y_0}{y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \right] \rho. \quad (3.7b)$$

U ovom modelu smo zanemarili steričke interakcije između proteina koji se gibaju po istom mikrotubulu, kao ni između vezivnih proteina i drugih proteina koji se nalaze na mikrotubulima. Jednadžbe (3.1)-(3.7) u potpunosti opisuju ponašanje mikrotubula u prisutnosti pasivnih vezivnih proteina.

U jednadžbi (3.4) se pojavljuje ovisnost o polarnom kutu, koji je stohastička varijabla, pa ona nema analitičko rješenje. Međutim, ako je gibanje mikrotubula značajno sporije nego što se mijenja raspodjela vezivnih proteina možemo pretpostaviti da vrijeme potrebno da mikrotubul napravi bilo koji nezanemariv pomak dovoljno dugo da vezivni protein uđu u stacionarnu raspodjelu. U tom slučaju možemo koristiti adijabatsku aproksimaciju $\partial\rho/\partial t = 0$. Također, u jednadžbama (3.6) se vidi da struja vezivnih proteina duž jedne koordinate ovisi o drugoj, što nije praktično za rješavanje, tako da uvodimo pomoćne koordinate $u = (r + z)/2$ i $w = (r - z)/2$. Intuitivno, u predstavlja udaljenost vezivnog proteina od pola, a w koliko je “nagnut” na lijevo ili desno od simetrale polarnog kuta. U ovim koordinatama jednadžba (3.4) postaje

$$\begin{aligned} -\left(\frac{\partial j_u}{\partial u} + \frac{\partial j_w}{\partial w}\right) + k_a c_0 \sqrt{\frac{k}{2\pi k_B T}} \exp\left[\frac{-ky_0^2 \left(\frac{y}{y_0} - 1\right)^2}{2k_B T}\right] \\ - k_{d0} \exp\left[\frac{k(y - y_0)}{f_c}\right] \rho(u, w) = 0, \end{aligned} \quad (3.8)$$

a struje su međusobno nezavisne,

$$j_u = \frac{D_m}{2} \left[\frac{4k}{k_B T} \sin^2 \frac{\theta}{2} u \left(1 - \frac{y_0}{y}\right) - \frac{\partial}{\partial u} \right] \rho, \quad (3.9a)$$

$$j_w = \frac{D_m}{2} \left[\frac{4k}{k_B T} \cos^2 \frac{\theta}{2} w \left(1 - \frac{y_0}{y}\right) - \frac{\partial}{\partial w} \right] \rho, \quad (3.9b)$$

Dodatna prednost ovih koordinata je da istegnuće nema miješani član, $y(u, w) = \sqrt{4 \sin^2 \frac{\theta}{2} u^2 + 4 \cos^2 \frac{\theta}{2} w^2}$. Jednadžba (3.8) i dalje nema rješenje zatvorene forme, no treba primijetiti da struje u prvom članu iščezavaju ako je gustoća dana točno Boltzmannovom raspodjelom. Drugim riječima, Boltzmannova raspodjela bi bila rješenje jednadžbe (3.8) kad bi stopa odvezivanja bila konstantna. U nastavku ćemo pokazati da je to dobra aproksimacija.

Primijetimo prvo da iznos momenta sile u ovim koordinatama iznosi

$$\begin{aligned} \tau = -k \sin \theta & \left[\int_0^{\frac{R}{2}} du \int_{-u}^u dw \rho(u, w) (u^2 - w^2) \left(1 - \frac{y_0}{y}\right) \right. \\ & \left. + \int_{\frac{R}{2}}^{\infty} du \int_{u-R}^u dw \rho(u, w) (u^2 - w^2) \left(1 - \frac{y_0}{y}\right) \right], \end{aligned} \quad (3.10)$$

a s obzirom da vrijedi $y_0 \ll R$, drugi integral možemo zanemariti. Moment sile ne ovisi izravno o gustoći, nego o njenom integralu, tako da je dovoljno pronaći dobru aproksimaciju za integral gustoće, a ne nužno i samu gustoću. Motivirani time, primijenit ćemo integral $\int_{-u}^u dw$ na homogeni dio jednadžbe (3.8). Gustoća $\rho(u, w)$ je parna u w jer je sustav invarijantan na zamjenu mikrotubula, tako da $\int_{-u}^u j_w dw$ iščezava. Zatim, vezivni proteini se nakupljaju u blizini koordinata $(u, w) = (y_0 / (2 \sin \frac{\theta}{2}), 0)$ jer je tamo stopa nakupljanja maksimalna, pa ćemo član $(1 - y_0/y)$ razviti oko te točke do prvog reda. Dobivamo integralno-diferencijalnu jednadžbu

$$-D_m \frac{\partial}{\partial u} \left[\frac{k}{4k_B T} \sin^2 \frac{\theta}{2} \left(u - \frac{y_0}{2 \sin \frac{\theta}{2}} \right) - \frac{\partial}{\partial u} \right] \int_{-u}^u \rho dw - \int_{-u}^u k_d(u, w) \rho dw = 0, \quad (3.11)$$

A kako bismo ostali samosuglasni, moramo i stopu otkvačivanja razviti do prvog reda, $k_d(u, w) = k_{d0} + k_u u + k_w w + \mathcal{O}_2(u, w)$. Uvodimo pokratu za integral gustoće, $Q(u) = \int_{-u}^u \rho dw$, te dobivamo običnu diferencijalnu jednadžbu za $Q(u)$:

$$-D_m \frac{\partial}{\partial u} \left(\frac{k}{4k_B T} \sin^2 \frac{\theta}{2} \left(-u + \frac{2u^2 \sin \frac{\theta}{2}}{y_0} \right) Q - \frac{\partial Q}{\partial u} \right) - k_{d0} Q - k_u u Q = 0, \quad (3.12)$$

gdje je ponovno zbog svojstva simetrije neparni integral $k_w \int_{-u}^u w \rho dw$ iščeznuo. Ovu jednadžbu rješavamo tako da koristimo razvoj $Q = Q_1 u + Q_2 u^2 + Q_3 u^3 + \mathcal{O}_4(u)$, te

usporedimo članove uz potencije u^0 i u^1 . Time dobivamo rekurzivske relacije za koeficijente u razvoju,

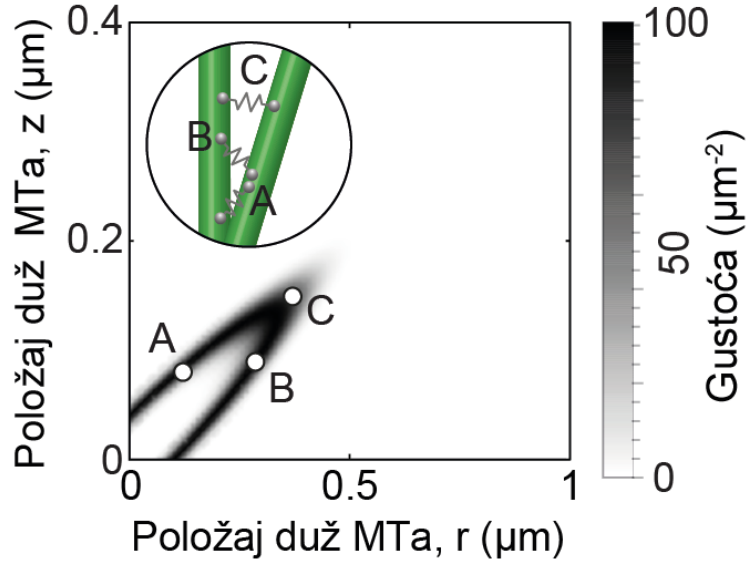
$$Q_2 = 0$$

$$D_m \frac{k}{2k_B T} \sin^2 \frac{\theta}{2} Q_1 + 6D_m Q_3 - k_{d0} Q_1 = 0 \quad (3.13)$$

U toj jednadžbi se doprinosi zbog difuzije i otkvačivanja pojavljuju uz isti koeficijent, pa možemo zaključiti da difuzijski doprinos dominira ako vrijedi $(kD_m/k_B T)(1 - \cos \theta) \gg k_{d0}$. Uvrštavajući tipične vrijednosti parametara (vidi Tablicu 1), vidimo da difuzijski doprinos dominira na kutovima $\theta \gg 10^{-3}$, a s obzirom da kuteve ispod nekoliko stupnjeva ne možemo razlučiti, pokazali smo je aproksimacija $k_d(r, z) = k_{d0}$ dobra za sve relevantne slučajeve. Uz tu aproksimaciju, dobivamo analitičko rješenje za gustoću vezivnih proteina,

$$\rho = \frac{k_a c_0}{k_{d0}} \sqrt{\frac{k}{2\pi k_B T}} \exp \left[-\frac{k(y - y_0)^2}{2k_B T} \right]. \quad (3.14)$$

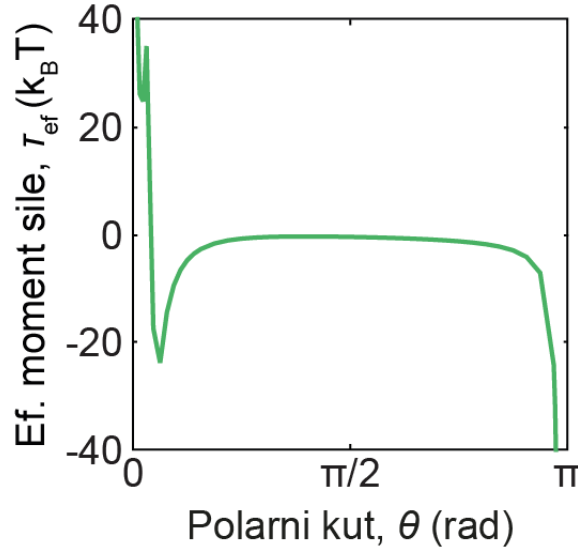
Ovakva raspodjela vezivnih proteina prikazana je na slici 2.7. Blizu polova, vezivni protein su raspodjeljeni tako da su njihove duljine blizu relaksirane duljine, $y \approx y_0$ (točke A i B na slici 2.7). Na većim udaljenostima od polova, to jest na koordinatama za koje vrijedi $2u \sin \frac{\theta}{2} > y_0$, svi vezivni protein su rastegnuti, $y > y_0$, te njihova gustoća brzo opada (točka C na slici 2.7).



Slika 2.7. *Gustoća pasivnih vezivnih proteina. Orijentacije vezivnih proteina na slici odgovaraju koordinatama točaka označenih na grafu. Koncentracija vezivnih proteina je $c_0 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, kut između mikrotubula je $\theta = 0.3 \text{ rad}$, a ostali parametri dani u Tablici 1.*

2.3.3 Putanje mikrotubula i potencijal interakcije

Uvrštavanjem izraza (3.14) za gustoću vezivnih proteina u jednadžbu (3.10) dobivamo moment sile kojim vezivni protein djeluju na mikrotubule. Na slici 2.8 prikazan je efektivni moment sile $\tau_{\text{ef}} = \tau + k_B T \cot \theta$, koji sadrži doprinos od vezivnih proteina i spuriozni drift koji nastaje zbog termalnih fluktuacija (vidi poglavlje 2.2.1), dobiven numeričkom integracijom. Kad su mikrotubuli blizu jedan drugom, dolazi do nakupljanja vezivnih proteina koji djeluju privlačnim (negativnim) momentom sile. Međutim, dodatnim smanjivanjem kuta između mikrotubula se povećava pozitivan doprinos člana $k_B T \cot \theta$, te efektivni moment sile ponovno postaje odbojan (pozitivan). Također, za kuteve za koje vrijedi $2R \sin \frac{\theta}{2} < y_0$, vezivnim proteinima prestane biti dostupna regija na mikrotubulima u kojoj su oni isključivo rastegnuti (vidi diskusiju u poglavlju 2.3.2 oko slike 2.7), te njihov doprinos efektivnom momentu sile iščezava.



Slika 2.8. Efektivni moment sile za pasivne vezivne proteine u ovisnosti o kutu između mikrotubula. Koncentracija vezivnih proteina je $c_0 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, a ostali parametri dani u Tablici 1.

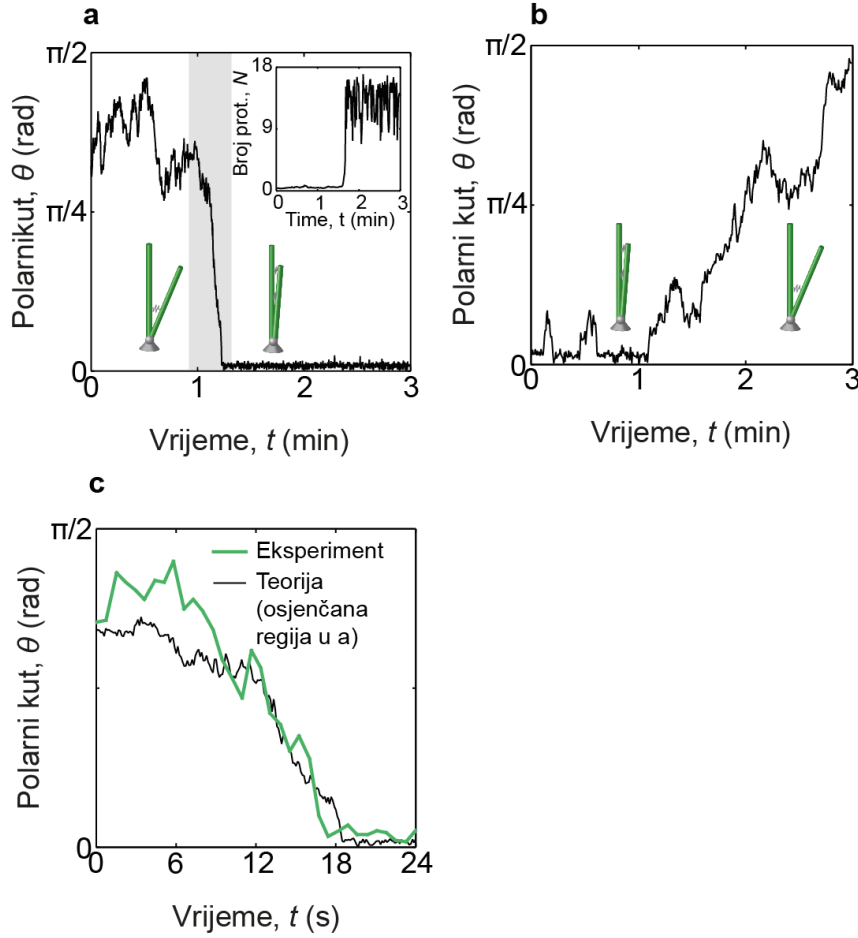
Prije nego nastavimo, izvest ćemo vrlo dobru aproksimaciju za integral u jednađbi (3.10), koja će nam olakšati simuliranje putanja i danje račune. Primjetimo da gustoća vezivnih proteina dana jednađbom (3.14) ovisi samo o istegnuću vezivnih proteina. Kako bismo iskoristili tu činjenicu, prvi ćemo transformirati položaj vezivnog proteina u polarne koordinate, $(u, w) \rightarrow (y, \beta)$, gdje je y njegovo istegnuće, a β kut koji vezivni protein zatvara sa simetralom kuta između mikrotubula, te vrijedi $u = y \cos \beta/2 \sin \frac{\theta}{2}$ i $w = y \sin \beta/2 \cos \frac{\theta}{2}$. Zbog velikog faktora $k/2k_B T$ u eksponentu jednađbe (3.14), gustoća brzo opada kako se istegnuće odmiče od relaksirane vrijednosti y_0 , pa se pravokutna regija integracije u jednađbi (3.10) može aproksimirati kružnim isječkom čiji je polumjer $R/2 \sin \frac{\theta}{2}$, a kut između $\pm \tan^{-1} \left(\cot \frac{\theta}{2} \right)$. Ova aproksimacija vrijedi za kuteve u kojima $R/2 \sin \frac{\theta}{2} > y_0$, a za manje kuteve ćemo pretpostaviti da vrijedi $\tau = 0$. Time smo jedan dvostruki integral sveli na dva jednostruka integrala,

$$\begin{aligned} \tau = & -\frac{k}{2} \Theta \left(\sin \frac{\theta}{2} - \frac{y_0}{2R} \right) \int_0^\infty \exp \left[-\frac{k(y - y_0)^2}{2k_B T} \right] y^2 (y - y_0) dy \\ & \times \int_{-\frac{\pi-\theta}{2}}^{\frac{\pi-\theta}{2}} \left(\left(\frac{\cos \beta}{\sin \frac{\theta}{2}} \right)^2 - \left(\frac{\sin \beta}{\cos \frac{\theta}{2}} \right)^2 \right) d\beta, \end{aligned} \quad (3.15)$$

gdje smo u granicama integracije po kutnoj varijabli koristili identitet $\tan^{-1}\left(\cot\frac{\theta}{2}\right) = (\pi - \theta)/2$, $\Theta(x - x_0)$ je Heaviside funkcija koja za neki argument x ima vrijednost 1 ako $x > x_0$ i 0 inače, a zbog jednostavnosti smo u gornjoj granici integrala po istegnućima stavili $R/2 \sin\frac{\theta}{2} \rightarrow \infty$. Ovi integrali imaju analitička rješenja, tako da je efektivni moment sile u ovoj aproksimaciji

$$\tau_{\text{ef}} = -\frac{k_a c_0}{k_{d0}} y_0 \frac{1 - (\theta - \pi) \sin \theta}{\sin \theta} \Theta\left(\sin \frac{\theta}{2} - \frac{y_0}{2R}\right) + k_B T \cot \theta. \quad (3.16)$$

Kako bismo provjerili da naš model zaista opisuje nastajanje paralelnih svežnjeva, numerički smo simulirali, koristeći Euler-Maruyama shemu, putanje za $\theta(t)$ uz različite početne uvjete za tipične parametre. Na slici 2.9 vidimo da putanje mikrotubula kvalitativno odgovaraju vezanju mikrotubula u paralelni svežanj. Ako nametnemo veliki početni kut između mikrotubula (slika 2.9a), on će se mijenjati nasumično dok se mikrotubuli međusobno ne približe. U tom trenutku, naglo naraste broj spojenih vezivnih proteina (umetak na slici 2.9a), a gibanje postane ograničeno na male kutove. Ako, s druge strane, nametnemo mali početni kut (slika 2.9b), mikrotubuli se mogu nakon nekog vremena odvojiti. Međutim, odvajanje mikrotubula se može sa nezanemarivom vjerojatnosti očekivati unutar 10 minuta (koliko traje cijeli proces mitoze) samo ako se drastično smanji koncentracija vezivnih proteina, u našem slučaju 10 puta, što daje dobre indikacije zašto se raspadanje već formiranih svežnjeva ne vidi u živim stanicama. Za usporedbu, na slici 2.9c su prikazani eksperimentalno mjereni kutovi, te vidimo da ti rezultati kvalitativno odgovaraju simulacijama u kojima se mikrotubuli vežu u svežanj (slika 2.9a).



Slika 2.9. Numeričke simulacije i eksperimentalna mjerenja kuta između mikrotubula. **(a)** Numerička simulacija putanje pri kojoj mikrotubuli počinju iz velikog početnog kuta, vrže nasumično gibanje i zatim se vežu u paralelni svežanj (oko 1:15 min). Početni kut je $\theta(0) = 1$ rad, a koncentracija $c_0 = 60 \mu\text{m}^{-1}$. U umetku je prikazan broj vezivnih proteina spojenih na mikrotubule. **(b)** Numerička simulacija putanje pri kojoj mikrotubuli počinju iz vezanog stanja, te se otkvaćuju (oko 1:00 min). Početni kut je $\theta(0) = 0.1$ rad, gustoća motornih proteina korištena ovdje je 10 puta manja nego u (a). **(c)** Eksperimentalna mjerenja kuta između mikrotubula. Crna linija je putanja u osjenčanoj regiji u (a). Ostali parametri korišteni u simulacijama dani su u Tablici 1.

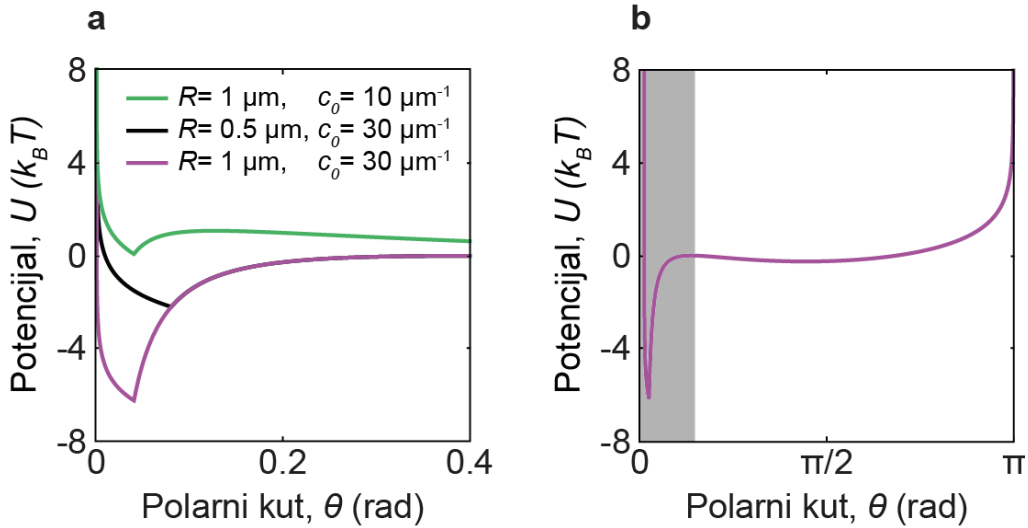
S obzirom da deterministički član u (3.16) nije linearan, nije moguće naći analitičko rješenje za raspodjelu kutova $p(\theta, t)$, no mnoge zanimljive rezultate koji povezuju mikroskopski opis mikrotubula s makroskopskim svojstvima sustava kao što su stabilnost ili prosječno vrijeme nastajanja svežnjeva možemo dobiti iz stacionarne distribucije kutova (za diskusiju o stacionarnim distribucijama vidi poglavlje 1.2.9). Kako bismo dobili bolju fizikalnu intuiciju za to kako se iz jednadžbe gibanja za jedan mikrotubul dobivaju makroskopska svojstva sustava, uvest ćemo pojam potencijala interakcije između mikrotubula, $U(\theta)$, koji je implicitno definiran relacijom

$$-\frac{\partial U}{\partial \theta} = \tau + k_B T \cot \theta. \quad (3.17)$$

Prednost adijabatske aproksimacije, $\partial \rho / \partial t = 0$, je to što je u tom slučaju potencijal vremenski neovisan. Integriranjem jednadžbe (3.17) dobivamo analitički izraz

$$U(\theta) = -k_B T \left[\theta_{\max} \left(\frac{\theta(\theta - \theta_{\min})}{\theta} + \frac{\theta(\theta_{\min} - \theta)}{\theta_{\min}} \right) + \ln(\sin \theta) \right], \quad (3.18)$$

gdje su korištene pokrate $\theta_{\max} = \frac{k_a c_0}{k_{d0}} y_0 \pi$, što predstavlja lokalni maksimum potencijala, i $\theta_{\min} = \frac{y_0}{R}$, što je njegov lokalni minimum.



Slika 2.10. Potencijal interakcije između mikrotubula. **(a)** Potencijal na malim kutevima za različite vrijednosti duljine mikrotubula i gustoće vezivnih proteina. Parametri dani u Tablici 1 i legendi. **(b)** Potencijal za sve kuteve. Osjenčana regija predstavlja regiju u (a). Parametri isti kao i za ljubičastu krivulji u (a).

Na slici 5.4a vidimo kako izgleda potencijal interakcije između mikrotubula u na malim kutevima za različite vrijednosti slobodnih parametara sustava, konkretno gustoće vezivnih proteina i duljine mikrotubula. Vidimo da povećanje koncentracije povećava i širinu i dubinu potencijalne jame, a povećanje duljine mikrotubula samo njenu širinu. Ponašanje s obzirom na variranje koncentracije je intuitivno: više vezivnih proteina stvara jače interakcije između mikrotubula. Činjenicu da je za dulje mikrotubule minimum potencijala na manjim kutevima možemo objasniti ako se sjetimo da, kao što se vid i iz momenta sile, na kutevima za koje vrijedi $2R \sin \frac{\theta}{2} <$

y_0 nema privlačne interakcije između mikrotubula. Potencijal logaritamski divergira na rubovima (potencijal za sve kuteve prikazan je na slici 5.4b), a ova divergencija je rezultat člana $-k_B T \ln(\sin \theta)$, koji je nastao integriranjem spurioznog drifta. Ovdje se jasno vidi kako taj član, koji je nastao isključivo zbog transformacije koordinata i ne ovisi o fizici sustava, osigurava da kut ne može nasumičnim pomacima izaći iz domene $[0, \pi]$. Dio koji je nastao zbog djelovanja vezivnih proteina, ako su njihove koncentracije dovoljno velike, stvara potencijalnu jamu na malim kutovima koja predstavlja vezano stanje (glavni graf na slici 5.4). Izraz (3.18) daje jednostavnu inverznu ovisnost između kuta koji zatvaraju mikrotubuli i jačine interakcije među njima.

2.3.4 *Stabilnost i prosječno vrijeme nastajanja svežnjeva*

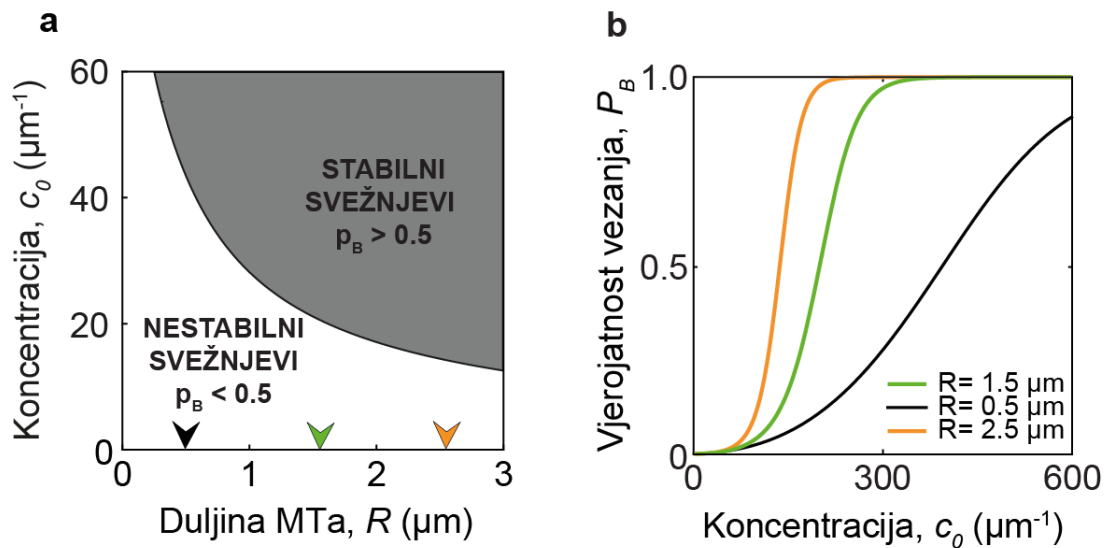
Iako putanje u numeričkim simulacijama kvalitativno nalikuju na vremenske serije kutova mjerenih u eksperimentu, brzina kojom se mikrotubuli vežu u svežanj nakon što jednom dođu dovoljno blizu je usporediva s brzinom snimanja, što onemogućava eksperimentalnu provjeru predviđenih mikroskopskih svojstava modela. Međutim, možemo dobiti makroskopska svojstva sustava u termičkoj ravnoteži, koja ćemo usporediti s teorijom. Kako bismo to mogli uraditi, trebamo prvo izračunati stacionarnu raspodjelu kutova, a lako je vidjeti da koristeći izraz (1.44) u našem modelu dobivamo da je stacionarna distribucija kutova upravo Boltzmannova,

$$p(\theta) = p_0 \exp \left[-\frac{U(\theta)}{k_B T} \right], \quad (3.19)$$

gdje je p_0 normalizacijska konstanta. Primijetimo još da je za slobodni mikrotubul, odnosno $c_0 = 0$, stacionarna raspodjela sinusna kao što i očekujemo za polarni kut. Lokalni maksimum potencijala u točki θ_{\max} je prirodna granica između slobodnog i vezanog stanja, što znači da u makroskopskom smislu naš sustav možemo zamisliti kao sustav s dva stanja. Vjerojatnost da je mikrotubul vezan u svežanj je $p_B = \int_0^{\theta_{\max}} p(\theta) d\theta$, a za svežnjeve kažemo da su stabilni ako je vjerojatnost da je mikrotubul vezan veća nego da je slobodan, odnosno ako je zadovoljeno $p_B \geq 0.5$. Rješavanjem integrala dobivamo da su svežnjevi stabilni ako vrijedi

$$\left(\frac{y_0}{2R} \right)^2 \exp \left(\frac{k_a c_0}{k_{d0}} y_0 \pi \right) > 1. \quad (3.20)$$

Na slici 5.5a prikazane su sve kombinacije slobodnih parametara, duljine mikrotubula i koncentracije vezivnih proteina za koje su svežnjevi stabilni. Na slici 5.5c su prikazane vjerojatnosti pronalaska vezanog stanja u stacionarnom stanju, te vidimo da osim za male duljine mikrotubula, uvjet (3.20) predstavlja vrlo oštru granicu između regije u kojoj uopće ne nastaju svežnjevi i regije u kojoj su svi mikrotubuli vezani.



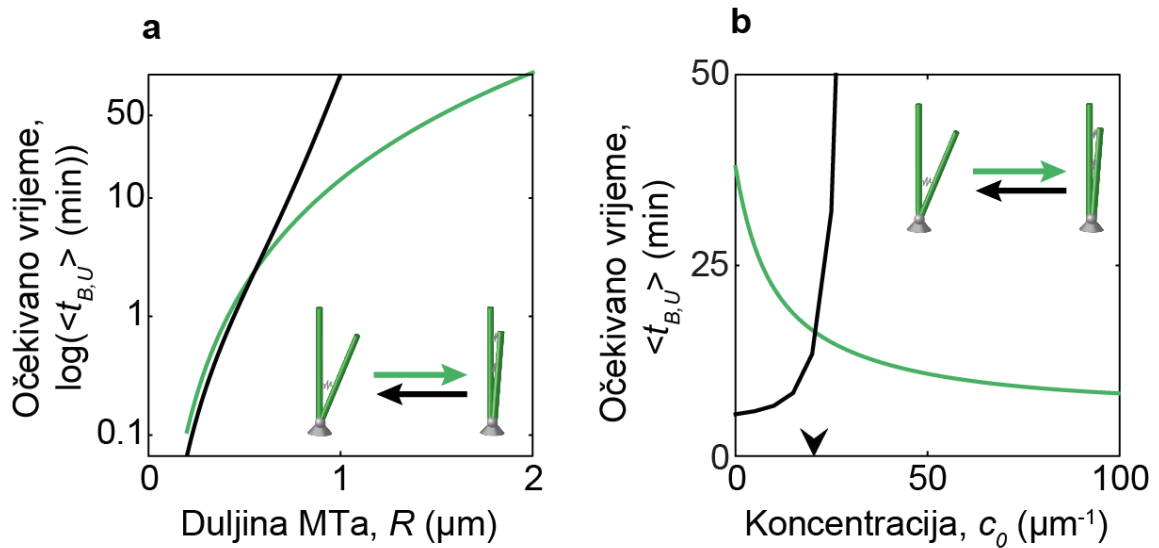
Slika 2.11. Stabilnost paralelnih svežnjeva i vjerojatnost vezanog stanja u ovisnosti o slobodnim parametrima. **(a)** Regija u parametarskom prostoru u kojoj su svežnjevi stabilni. **(b)** Vjerojatnost nalaženja vezanog stanja u ovisnosti o koncentraciji vezivnih proteina. Boje strelica u (a) odgovaraju vrijednostima duljine mikrotubula u (b).

S obzirom da se mikrotubuli stalno stvaraju i raspadaju, stacionarna distribucija nam ne daje potpunu informaciju o stanju mikrotubula u živoj stanici. Međutim, osim stabilnosti mikrotubula, stacionarna distribucija se može koristiti i da se odredi očekivano vrijeme nastajanja svežnja. Nastajanje svežnja možemo interpretirati kao problem prvog nailaska, a očekivano vrijeme da mikrotubul dođe iz nekog proizvoljnog kuta θ u minimum potencijala θ_{\min} glasi

$$\langle t \rangle_{\theta, \theta_{\min}} = \frac{1}{D} \int_{\theta_{\min}}^{\theta} \frac{\int_{\theta'}^{\pi} p_s(\theta'') d\theta''}{p_s(\theta')} d\theta'. \quad (3.21)$$

Pretpostavimo da je mikrotubul počeo iz slobodnog stanja $\theta \in [\theta_{\max}, \pi]$, te da je početni kut dan izotropnom raspodjelom. Tada je očekivano vrijeme nastajanja svežnja integral vremena prvog nailaska po svim početnim kutevima, $\langle t_B \rangle =$

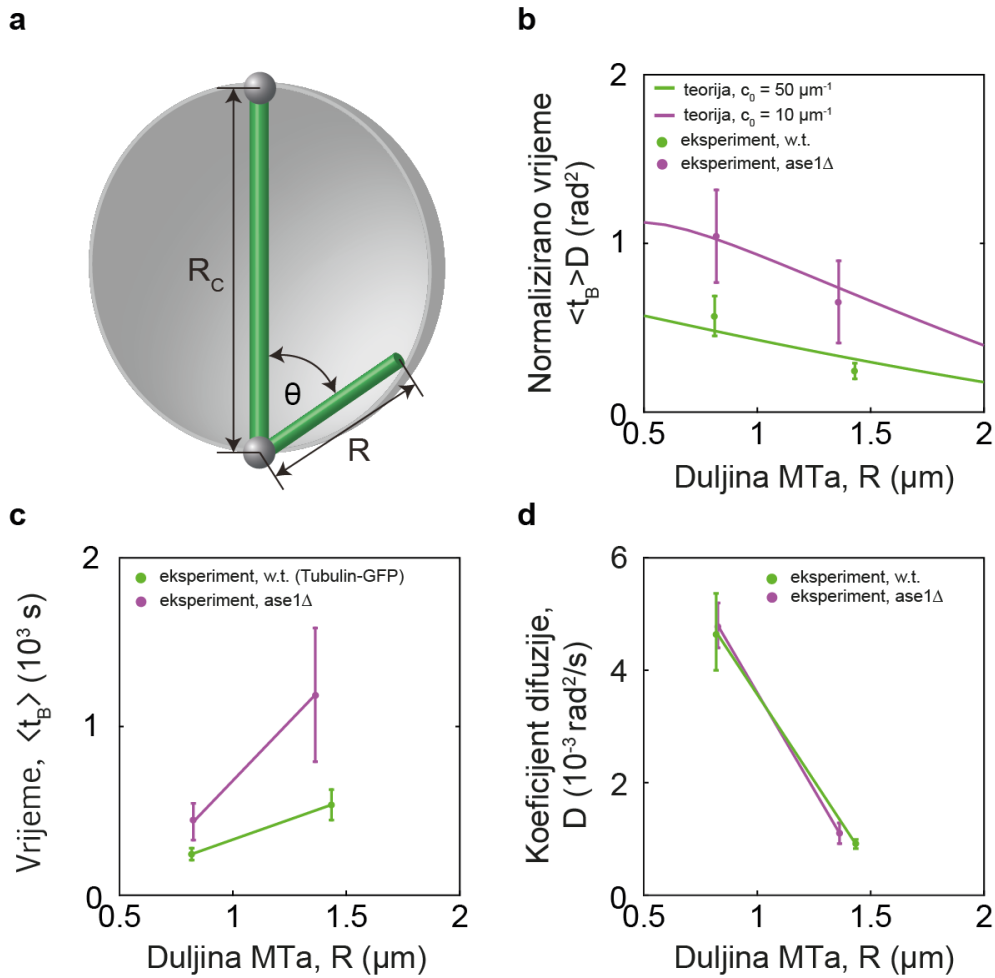
$\frac{1}{2} \int_{\theta_{\min}}^{\pi} \langle t \rangle_{\theta, \theta_{\min}} \sin \theta d\theta$. Analogno, očekivano vrijeme odvezivanja svežnjeva računamo kao očekivano vrijeme potrebno da mikrotubul iz minimuma potencijala dođe u neki izotropno raspodjeljeni nasumični kut u regiji $\theta \in [\theta_{\max}, \pi]$, odnosno $\langle t_U \rangle = \frac{1}{2} \int_{\theta_{\min}}^{\pi} d\theta \sin \theta \langle t \rangle_{\theta_{\min}, \theta}$, gdje je $\langle t \rangle_{\theta_{\min}, \theta}$ očekivano vrijeme prvog nailaska iz θ_{\min} u θ i računa se po formuli analognoj jednadžbi (3.21). Trostruki integrali su riješeni numeričkom integracijom, a vremena nastajanja i odvezivanja svežnjeva, a rezultati su prikazani na slici 5.6. Vidimo da je za kratke mikrotubule vrijeme nastajanja i odvezivanja svežnjeva približno jednako (slika 5.6a), a nakon što duljina pređe kritičnu točku koja odgovara duljini na kojoj počinju nastajati stabilni svežnjevi za danu koncentraciju (slika 5.4a i jednadžba 3.20), vrijeme nastajanja svežnjeva postaje značajno kraće (za $R = 1 \mu\text{m}$, vrijeme nastajanja svežnjeva je pet puta kraće nego vrijeme odvezivanja). Vrijeme odvezivanja raste linearno na logaritamskoj skali jer glavni doprinos dolazi od recipročnog koeficijena difuzije (vidi jednadžbu (3.21)) koji raste s duljinom mikrotubula kao $1/D \propto R^3$. Ako duljinu mikrotubula držimo konstantnom, a variramo koncentraciju vezivnih proteina, vrijeme nastajanja svežnjeva je dulje nego vrijeme njihovog odvezivanja. Kako se povećava koncentracija, vrijeme nastajanja svežnjeva postaje kraće, dok vrijeme odvezivanja raste (slika 5.4b). Za vrijednost koncentracije na kojoj počinju nastajati stabilni svežnjevi, vremena su jednaka, a nakon te vrijednosti vrijeme odvezivanja značajno raste te ubrzo doseže vremena dulja od trajanja cijelog procesa stanične diobe. Na primjer, za koncentraciju dvostruko veću od kritične, vrijeme odvezivanja se poveća 1000 puta.



Slika 2.12. Vrijeme nastajanja svežnjeva (zelene linije) i njihovog ovezivanja (crne linije) u ovisnosti o slobodnim parametrima. **(a)** Očekivano vrijeme u ovisnosti o duljini mikrotubula (logaritamska skala) za koncentraciju vezivnih proteina $c_0 = 30 \mu\text{m}^{-1}$. **(b)** Očekivano vrijeme u ovisnosti o koncentraciji vezivnih proteina za mikrotubule duljine $R = 1 \mu\text{m}$. Ostali parametri dani u Tablici 1.

2.3.5 Usporedba teorijskih predviđanja s eksperimentalnim merenjima

Već smo spomenuli da kutevi na kojima se događa vezanje premali da bi dinamika na njima bila razlučiva svjetlosnim mikroskopom. Međutim, zahvaljujući tome što znamo kako iz jednadžbe gibanja dobiti potencijal interakcije, a time i stacionarnu raspodjelu, možemo uspoređivati makroskopska svojstva sustava u eksperimentu i u teoriji. Znamo iz jednadžbe (3.21) da je vrijeme formiranja svežnjeva obrnuto proporcionalno difuzijskoj konstanti, a difuzijska konstanta značajno varira s duljinom mikrotubula (Tirado i de la Torre, 1980) te tako čini značajan doprinos vremenu vezanja koji je ne ovisi o dinamici vezivnih proteina (vidi diskusiju oko slike 2.12a u poglavlju 2.3.4). Kako bismo eliminirali ovisnost o difuzijskom koeficijentu, uvest ćemo bezdimenzionalna vremena vezanja i odvezivanja normirana difuzijskim koeficijentom, $D\langle t_B \rangle$ i $D\langle t_U \rangle$. Također, kako bismo mogli usporediti teoriju s eksperimentom, moramo još uvrstiti rubni uvjet zbog postojanja stanične ovojnice (slika 2.13a). Normalizirano vrijeme vezanja uz taj rubni uvjet prikazano je punim crtama na slici 2.13b. Zbog usporedbe, mjerili smo vrijeme potrebno da nastanu svežnjevi u eksperimentu.



Slika 2.13. Usporedba vremena vezanja u teoriji i eksperimentu. **(a)** Shematski prikaz rubnog stanične ovojnice koja definira rubni uvjet. **(b)** Normalizirano vrijeme vezanja u ovisnosti o duljini mikrotubula za dvije različite vrijednosti koncentracije u teoriji (pune crte), odnosno za neperturbirane stanice (w.t., zelene točke) i stanice bez ase1 (ase1Δ, ljubičaste točke). Skica prikazuje rubni uvjet, $R_c = 3 \mu\text{m}$. **(c)** Vrijeme nastajanja svežnjeva u eksperimentu. **(d)** Izmjerena difuzijska konstanta mikrotubula. Tip stanice u (c) i (d) prate istu konvenciju boja kao i (b), a linije su samo da vode oko.

Rezultati tih mjerenja prikazani su na slici 2.13c za neperturbirane stanice (zeleno; dalje u tekstu w.t., od engl. *wild type*) i stanice s eliminiranim ase1 vezivnim proteinima (ljubičasto; dalje u tekstu ase1Δ) za koje znamo da sudjeuju u nastajanju svežnjeva mikrotubula. Očekivano vrijeme je izračunato po formuli $\langle t_B \rangle = t_{\text{exp}}/n$, gdje je t_{exp} ukupno vrijeme promatranja u eksperimentu, a n broj mikrotubula koji su formirali svežnjeve. Bez obzira na tip stanice, vidimo da kratki mikrotubuli brže formiraju svežnjeve, a za sve duljine mikrotubula je taj proces značajno sporiji u ase1Δ stanicama. Mjerenja koeficijenta kutne difuzije su prikazana na slici 2.13d, te kao što je i za očekivati on ne ovisi o prisustvu vezivnih proteina. Točke s marginama

na slici 2.13b predstavljaju eksperimentalno mjereno normirano vrijeme nastajanja svežnjeva, $D\langle t_B \rangle$, i vidi se da poštuju isti trend kao i teorijski rezultati. Koncentracije vezivnih proteina su slobodni parametar, a ovdje su procijenjene tako da smo za w.t. stanice koristili $c_0 = 50 \mu m^{-1}$, što je blizu eksperimentalnih opservacija. U $ase1\Delta$ je prosječno vrijeme formiranja svežnjeva značajno dulje, a naši rezultati impliciraju da eliminiranje ovog vezivnog proteina smanjuje efektivnu koncentraciju pet puta. Ovi rezultati impliciraju da teorijski model može opisati nastajanje paralelnih svežnjeva mikrotubula in vivo. Činjenica da svežnjevi i dalje mogu nastati unatoč eliminaciji pasivnog vezivnog proteina Ase1 ukazuje na posojanje drugih vezivnih proteina koji, iako u manjoj mjeri, također pridonose nastajanju svežnjeva, a moguće je i da se radi o aktivnim motorima.

2.3.6 *Gustoća motora i moment sile koji oni stvaraju*

Osim pasivnih vezivnih proteina, in vitro eksperimenti (Ziebert et al., 2009) pokazuju da reorijentaciju mikrotubula u svežnjeve mogu omogućavati molekularni motori koji koriste energiju kako bi se kretali prema plus ili minus kraju mikrotubula (vidi poglavlje 1.1.3). Model razvijen u poglavlju 2.3.1 može se koristiti i za opisivanje dinamike mikrotubula koji rastu iz istog pola (slika 2.7) u prisutnosti motora, pri čemu se za brzinu njihovog gibanja duž mikrotubula treba koristiti jednačba (2.16), tako da struje motora iznose

$$j_r = v_0 \rho \left[1 - \frac{k(r - z \cos \theta)}{f_0} \left(1 - \frac{y_0}{y} \right) \right] - D_v \frac{\partial \rho}{\partial r}, \quad (3.22a)$$

$$j_z = v_0 \rho \left[1 + \frac{k(z - r \cos \theta)}{f_0} \left(1 - \frac{y_0}{y} \right) \right] - D_v \frac{\partial \rho}{\partial z}, \quad (3.22b)$$

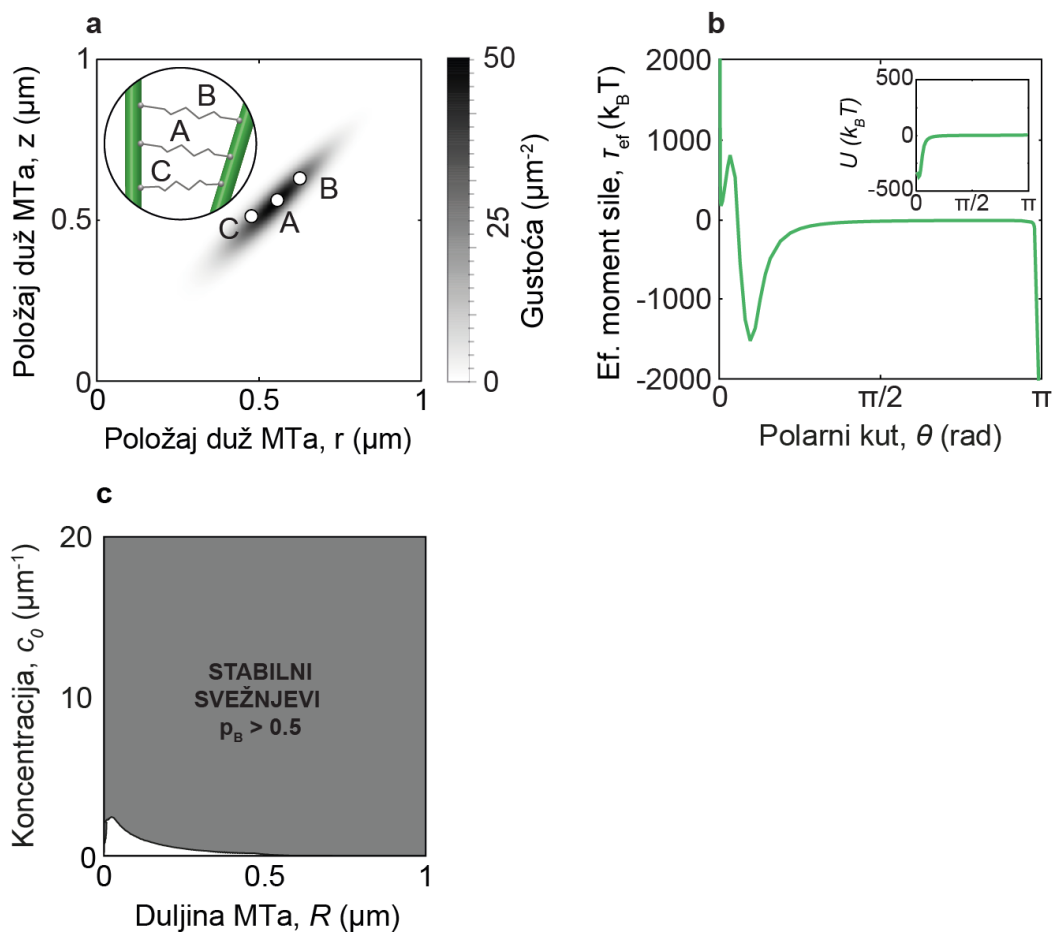
Uvrštavanjem ovih izraza u jednačbu (3.4) dobivamo jednačbu za gustoću motora duž mikrotubula. Međutim, čak i uz iste aproksimacije kao i za pasivne vezivne proteine (konstantna stopa odvajanja i adijabatska aproksimacija, vidi poglavlje 2.6.4) nije moguće dobiti analitički izraz za gustoću motora. Zbog toga uvodimo još aproksimaciju, a to je da je kretanje motora brzo u odnosu na njihovo odvajanje. U tom slučaju svaki motor koji se spoji stigne u svoju konačnu orijentaciju prije nego se stigne odvojiti od mikrotubula. Drugim riječima, gustoća motora se računa pod pretpostavkom da se na mikrotubulima nalazi konstantan broj motora koji je točno jednak njihovom broju u adijabatskoj aproksimaciji (vidi jednačbu (3.6) i diskusiju

oko nje u poglavlju 2.3.1). Ovu pretpostavku se može opravdati usporedbom vremenskih skala kretanja motora i njihovog odvajanja, a ona vrijedi u našem modelu jer vrijedi $kv_0/f_0 \gg k_{\text{off}}$, pa je time izraz za gustoću motora

$$\rho(r, z) = N \frac{\exp \left[\frac{v_0}{D_v} \left(r + z - \frac{k(y - y_0)^2}{2f_0} \right) \right]}{\int_0^R dr \int_0^\infty dz \exp \left[\frac{v_0}{D_v} \left(r + z - \frac{k(y - y_0)^2}{2f_0} \right) \right]}, \quad (3.23)$$

gdje je $N(\theta)$ ukupni broj motora spojenih na oba mikrotubula dan jednadžbom (3.6), a integral u nazivniku je normalizacija. Ova jednadžba vrijedi bez obzira kreću li se motori prema plus ili minus kraju, ali treba imati na umu da smjer kretanja motora određuje predznake brzine v_0 i kritične sile f_0 .

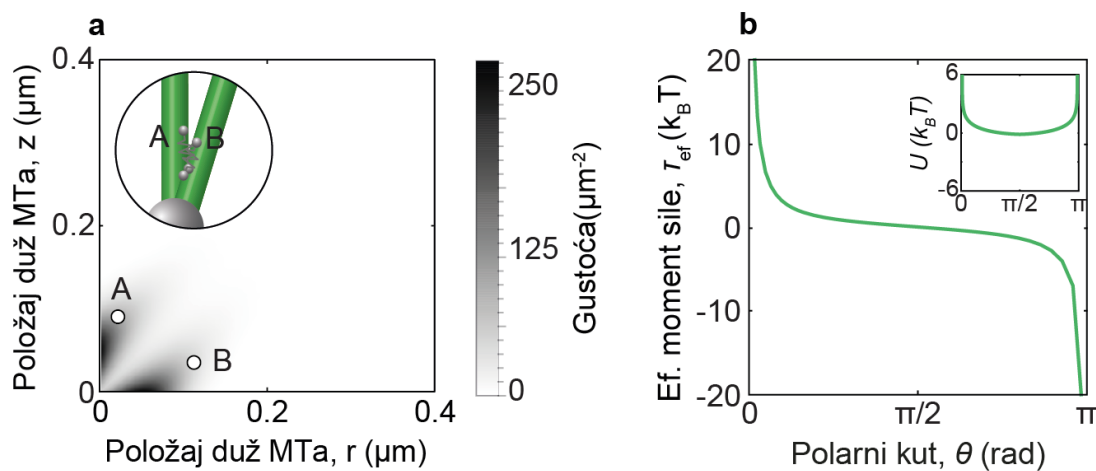
Promotrimo prvo slučaj kad se motori kreću prema plus kraju. Na slici 2.14a prikazana je gustoća motora za isti kut između mikrotubula i koncentraciju kao u slučaju pasivnih vezivnih proteina na slici 2.8. Zbog njihovog gibanja prema vrhovima mikrotubula, raspodjela je Gausijan oko točke na kojoj su projekcije elastične sile $\mathbf{f} \cdot \hat{\mathbf{r}}$ i $\mathbf{f} \cdot \hat{\mathbf{z}}$ jednake sili zaustavljanja f_0 . Zbog invarijantnosti jednadžbe (3.23) na zamjenu r i z koordinata, dobivamo da je maksimum raspodjele (točka označena A na slici 2.14a) u točki $(r, z) = (u_0, u_0)$, gdje je $u_0 = (y_0 + \Delta y)/2 \sin \frac{\theta}{2}$, a $\Delta y = f_0/k \sin \frac{\theta}{2}$ je pomak od opuštenog istenuća zbog gibanja motora. Gustoća blago opada kako se pomičemo prema polu ili vrhu mikrotubula, a “naginjanje”, odnosno odstupanje od konfiguracije u kojoj vrijedi $r = z$ značajno smanjuje gustoću motora (točke označene B i C na slici 2.14a). Razlog ovakvog ponašanja se lako vidi ako se jednadžba (3.23) transformira u (u, w) koordinate (vidi poglavlje 2.3.2), nakon čega se dobiva da je varijanca u u koordinati, koja predstavlja pomicanje prema vrhu mikrotubula ili polu, proporcionalna s $1/\sin \frac{\theta}{2}$, a varijanca u w koordinati, koja predstavlja “nagib” motora je proporcionalna s $1/\cos \frac{\theta}{2}$.



Slika 2.14. Gustoća i moment sile za motore koji se kreću prema plus kraju mikrotubula. **(a)** Gustoća pasivnih motora. Orijentacije vezivnih proteina na slici odgovaraju koordinatama točaka označenih na grafu. **(b)** Efektivni moment sile u ovisnosti o kutu između mikrotubula. Umetak predstavlja potencijal interakcije između mikrotubula. **(c)** Regija u parametarskom prostoru u kojoj su svežnjevi stabilni. Koncentracija motora u (a) i (b) je $c_0 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, kut između mikrotubula u (a) je $\theta = 0.3 \text{ rad}$, a ostali parametri dani u Tablici 1.

Numeričkom integracijom momenta sile, uz raspodjelu danu jednadžbom (3.23), dobivamo efektivni moment sile koji stvaraju motori koji se kreću prema plus kraju mikrotubula (slika 2.14b). Vidimo da za istu koncentraciju i duljinu mikrotubula, motori koji se kreću prema plus kraju mikrotubula proizvode dva reda veličine jači moment sile nego pasivni vezivni proteini. Razlog toga je što je gustoća za pasivne vezivne proteine maksimalna u točkama u kojima se oni nalaze u opuštenom stanju, dok motori u maksimumu gustoće imaju pozitivno istegnuće Δy , odnosno proizvode privlačne sile. Osim toga, motori su dulji od pasivnih vezivnih proteina i kreću se prema vrhovima mikrotubula, što povećava krak sile, a time i moment sile. Kao što bismo i očekivali, integriranjem po kutevima dobivamo i da je

efektivni potencijal značajno veći za motore koji se kreću prema plus kraju mikrotubula (umetak na slici 2.14b). Variranjem parametara se dobiva da je potencijal, osim u slučaju vrlo male koncentracije ($c_0 < 1 \mu\text{m}^{-1}$ za $R > 0.3 \mu\text{m}$) uvijek privlačan, odnosno nema lokalni maksimum. Zbog izrazito jakog privlačnog potencijala, potrebno je vrlo malo motora koji se kreću prema plus kraju da bi nastali stabilni svežnjevi (slika 2.14c), a zbog toga što je potencijal uvijek privlačan, regije gdje su mikrotubuli slobodni ili vezani nisu dobro definirani, što znači da niti prosječno vrijeme vezanja nije dobro definirano (vidi poglavlje 2.3.4).



Slika 2.15. Gustoća i moment sile za motore koji se kreću prema minus kraju mikrotubula. **(a)** Gustoća pasivnih motora. Orijentacije vezivnih proteina na slici odgovaraju koordinatama točaka označenih na grafu. **(b)** Efektivni moment sile u ovisnosti o kutu između mikrotubula. Umetak predstavlja potencijal interakcije između mikrotubula. Koncentracija motora je $c_0 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, kut između mikrotubula u (a) je $\theta = 0.3 \text{ rad}$, a ostali parametri dani u Tablici 1.

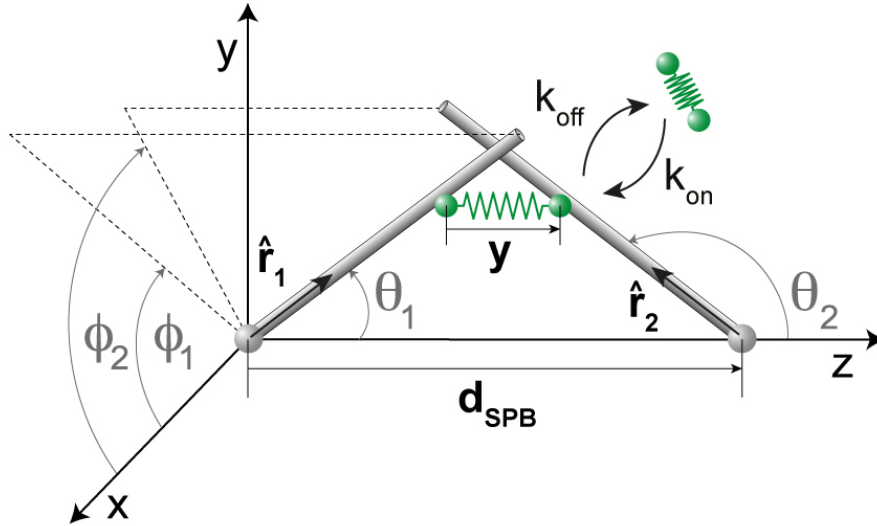
Slučaj motora koji se kreću prema minus kraju mikrotubula se dobiva tako da se promjene predznaci brzine i sile zaustavljanja, v_0 i f_0 , u jednadžbi (3.23). U tom slučaju, motori se nakupljaju u blizini polova (slika 2.15a), ali gustoća nije Gaussijan, nego ima dva maksimuma u točkama $(r, z) = (y_0 - \Delta y, 0)$ (točka označena s A na slici 2.15a) i $(r, z) = (0, y_0 - \Delta y')$ (točka označena s B na slici 2.15a), gdje je $\Delta y' = f_0/k$. Ovakva raspodjela se može intuitivno shvatiti ako zamislimo motor koji se nalazi u položaju u kojem $r = z$. S obzirom da se oba njegova kraja kreću prema polu, on će postajati komprimiran i nalaziti se u stanju labilne ravnoteže. Čim jedan od njegovih krajeva, zbog fluktuacija u njihovim brzinama, dođe bliže polu nego drugi, on će se početi brže gibati prema polu te na kraju doći do pola. Ako je jedan

kraj na polu, drugi će biti u točki u kojoj je odbojna elastična sila uravnotežena sa silom zaustavljanja, odnosno $k\Delta y' = f_0$. Zbog simetrije je jednako vjerojatno za bilo koji od krajeva da bude taj koji “proklizne” na pol, pa gustoća ima dva maksimuma jednakih amplituda. Iako su u maksimumima gustoće motori komprimirani za $\Delta y'$, oni ne stvaraju odbojne momente sile jer su u tim konfiguracijama oni paralelni s mikrotubulima. Zbog toga što su motori pretežito paralelni s mikrotubulima, oni ne pridonose momentu sile, tako da u efektivni momentu sile (slika 2.15b), a time i u potencijalu (umetak na slici 2.15b), dominira spuriozni drift, odnosno mikrotubuli se u prisutstvu motora koji se kreću prema minus kraju mikrotubula kreću slobodnom kutno difuzijom.

2.4 Nastajanje antiparalelnih svežnjeva

2.4.1 Geometrija s dva mikrotubula

Osim parallenih svežnjeva, mikrotubuli se mogu povezivati i u antiparalelne svežnjeve koji se, u najjednostavnijem sučaju, sastoje od dva mikrotubula koji rastu iz suprotnih polova. U nastavku ćemo, koristeći pretpostavke modela koji smo razvili u poglavlju 2.3, a mijenjajući geometriju, razviti model koji opisuje dva mikrotubula koji se rotiraju svaki oko svog pola i vežu se antiparalelno (Winters et al., 2019). Kao i prije, pretpostavljamo da su mikrotubuli tanki, čvrsti štapovi koji su labilno vezani na polu a sve varijable vezane uz prvi ili drugi mikrotubul svugdje označavamo indeksima 1 i 2. Polovi su i dalje nepomični, a gibanje mikrotubula je isključivo rotaciono, tako da njihove orijentacije označavamo jediničnim vektorima $\hat{\mathbf{r}}_{1,2}$. Polove ćemo postaviti tako da je prvi u ishodištu, a drugi pomaknut od prvog duž z-osi za duljinu d_{SPB} . Drugim riječima, vektor koji povezuje prvi i drugi pol je $\mathbf{d}_{\text{SPB}} = d_{\text{SPB}}\hat{\mathbf{z}}$. Skica modela dana je na slici 6.1.



Slika 6.1. Model za nastajanje antiparalelnih svežnjeva. Mikrotubuli (bijeli štapovi) mogu rotirati oko pola diobenog vretena (sive kugle), a na njih djeluju vezivni proteini (zelene opruge). Položaji mikrotubula dani su jediničnim vektorima $\hat{\mathbf{r}}_1$ i $\hat{\mathbf{r}}_2$, a polovi su razmaknuti za d_{SPB} . Vezivni proteini se zakvačuju s obje glave na mikrotubul stopom k_{on} i otkvačuju stopom k_{off} , a njihovo istegnuće kad su spojeni je y . Kutovi predstavljaju orijentacije mikrotubula u sfernim koordinatama oko pripadnog pola.

Mikrotubuli pivotiraju svaki oko svog pola kutnim brzinama $\boldsymbol{\omega}_{1,2}$, pa vektori orijentacije imaju jednadžbe

$$\frac{d\hat{\mathbf{r}}_{1,2}}{dt} = \boldsymbol{\omega}_{1,2} \times \hat{\mathbf{r}}_{1,2}. \quad (4.1)$$

Ponovno se nalazimo u granici velikog trenja,

$$\gamma_{1,2} \boldsymbol{\omega}_{1,2} = \mathbf{T}_{1,2}, \quad (4.2)$$

gdje $\gamma_{1,2}$ predstavljaju koeficijente trenja, a momenti sile su $\mathbf{T}_{1,2} = \boldsymbol{\tau}_{1,2} + \sigma_{1,2} [\hat{\mathbf{r}}_{1,2} \times \boldsymbol{\eta}_{1,2}(t)]$. Nasumične sile imaju intenzitete koji ovise o koeficijentima trenja $\sigma_{1,2} = \sqrt{2k_B T \gamma_{1,2}}$, a 3-dimenzionalni vektori koji predstavljaju bijeli šum, $\boldsymbol{\eta}_{1,2}$, imaju međusobno nezavisne komponente. Jednadžbe gibanja su analogne jednadžbi (2.2),

$$\boldsymbol{\omega}_{1,2} = D_{1,2} \frac{\boldsymbol{\tau}_{1,2}}{k_B T} + \sqrt{2D_{1,2}} [\hat{\mathbf{r}}_{1,2} \times \boldsymbol{\eta}_{1,2}(t)], \quad (4.3)$$

gdje smo koristili već poznati izraz za koeficijent difuzije $D_{1,2} = k_B T / \gamma_{1,2}$. Jednadžbe za $\boldsymbol{\omega}_1$ i $\boldsymbol{\omega}_2$ su vezane jer moment sile uzrokuje vezivni proteini koji spajaju mikrotubule.

Dodatna komplikacija je to što su u ovoj geometriji krakovi sile mnogo veći. Kod paralelnih svežnjeva, vezivni proteini su bili vezani oko ishodišta, tako da su krakovi bili usporedivi s istegnućem motora, y_0 , što je reda veličine desetak nanometara. U slučaju antiparalelnog vezanja, vezivni proteini se vežu oko mjesta gdje se mikrotubuli susreću, što znači da su krakovi sile usporedivi s razmakom između polova, d_{SPB} , što je reda veličine mikrona. Ova činjenica ima dvije implikacije koje moramo uzeti u obzir pri razvijanju modela. Prvo, ne vrijedi adijabatska aproksimacija. Mali pomaci mikrotubula mogu dovesti do značajne promjene geometrije na koju se vezivni proteini ne stignu prilagoditi. Drugo, ne možemo koristiti aproksimaciju srednjeg polja. Zbog velikih krakova sile, prikvačivanje i otkvačivanje pojedinačnih vezivnih proteina dovodi do skokovitih promjena trenutnog momenta sile. Zbog toga moramo za moment sile koristiti egzaktni izraz

$$\boldsymbol{\tau}_{1,2} = \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i \mathbf{r}_{1,2;i} \times \mathbf{f}_{1,2;i}, \quad (4.4)$$

gdje je N_0 ukupan broj vezivnih proteina u sustavu, a indeksi su onda $i = \{1, \dots, N_0\}$. Kako bismo osigurali da samo vezivni proteini koji su spojeni za oba mikrotubula proizvode silu, stanje vezivnog proteina ε_i može biti $\varepsilon_i = 1$ ako je vezivni protein spojen ili $\varepsilon_i = 0$ ako nije. Silu ponovno računamo kao da su vezivni proteini Hookeove opruge, ali zbog jednostavnosti pretpostavljamo da je njihova opuštena duljina zanemariva, y_0 , pa je sila koju proizvodi i -ti vezivni protein

$$\mathbf{f}_{1,2;i} = \pm k \mathbf{y}_i \left(1 - \frac{y_{0,m}}{y_i} \right), \quad (4.5)$$

gdje je istegnuće proteina u ovoj geometriji $\mathbf{y}_i = \mathbf{r}_{2,i} + \mathbf{d}_{\text{SPB}} - \mathbf{r}_{1,i}$, y_i iznos istegnuća, a $y_{0,m}$ istegnuće motora u opuštenom stanju.

2.4.2 Dinamika molekularnih motora

Iz prijašnjih eksperimenata znamo da su za vezanje mikrotubula u antiparalelne svežnjeve potrebni vezivni proteini koji se gibaju prema minus kraju mikrotubula (Hepperla et al., 2014), a to smo i potvrdili u našim eksperimentima na stanicama kojima je termalno uklonjen motor Cut7 (slika 2.5), koji se, kad je spojen na antiparalelne mikrotubule, kreće prema minus kraju mikrotubula (Britto et al., 2016). Za razliku od našeg modela koji opisuje nastajanja paralelnih svežnjeva (poglavlje

2.3) u kojem smo proučavali doprinose svih vrsta vezivnih proteina, ovdje ćemo se usredotočiti samo na dinamiku mikrotubula u prisutnosti motora koji se kreću prema minus kraju. Motori se vežu na mikrotubule na udaljenosti $r_{1,2;i}$ od pripadnog pola, a brzina kojom se oni kreću dobiva se iz jednačbe (2.16) i u ovim koordinatama iznosi

$$\frac{dr_{1,2;i}}{dt} = v_0 \left[1 - \frac{\mathbf{f}_{1,2;i} \cdot \hat{\mathbf{r}}_{1,2}}{f_0} \right] + \sqrt{2D_v} \eta_{1,2;i}. \quad (4.6)$$

gdje je v_0 brzina motora bez opterećenja, f_0 sila zaustavljanja, a D_v varijanca fluktuacija u njihovoj brzini.

Za razliku od slučaja kad mikrotubuli rastu iz istog pola (poglavlje 2.3), ovdje ne možemo primijeniti aproksimaciju srednjeg polja tako da sume zamijenimo integralom po gustoći. Razlog tome je se u slučaju paralelnih svežnjeva vezivni proteini vežu na mikrotubule blizu pola gdje su momenti sila mali, tako da je doprinos pojedinačnih vezivnih proteina malen. Čak i u slučaju kad su mikrotubuli skoro paralelni i vezivni proteini se mogu vezati blizu vrhova, relativni doprinos pojedinačnih događaja vezanja i odvezivanja je relativno malen jer je u tom slučaju vezano mnoštvo vezivnih proteina. U slučaju geometrije u kojoj mikrotubuli rastu iz različitih polova, očekujemo da će se motori nakupljati na mjestu gdje mikrotubuli dolaze u kontakt, tako da će njihovi krakovi sila biti usporedivi s $d_{SPB} \sim 1 \mu\text{m}$, čak i kad je vrlo malo spojenih motora. Veliki krakovi dovode to velikih momentata sile, tako da su doprinosi pojedinačnih motora značajni, te je važno uzeti u obzir i diskretnost motora pri računanju momenta sile u svakom trenutku.

Kako bismo ispravno modelirali vezanje i odvezivanje pojedinačnih motora, njihovo stanje u svakom trenutku ćemo opisati stohastičkim procesom $\varepsilon_i \equiv \varepsilon_i(t)$. Kako bismo konstruirali taj proces, promotrit ćemo prvo kako se ponaša jedan motor, a zatim generalizirati na N_0 motora. Zbog jednostavnosti zapisa ćemo za sada ispustiti indeks motora i . U početnom trenutku $t = 0$, motor može imati početno stanje $\varepsilon = 0$ ili $\varepsilon = 1$, a ta stanja predstavljaju redom slobodan i vezani motor. Pretpostavimo da je početno stanje $\varepsilon(0) = 0$. Spajanje motora za mikrotubule modeliramo kao diskretni stohastički proces (vidi poglavlje 1.2.3), čija stopa $k_{\text{on}}(\mathbf{y})$ ovisi o trenutnom istegnuću slobodnog motora u nukleoplazmi, za koje ćemo ponovno pretpostaviti da je dano Boltzmannovom raspodjelom, te trenutnoj orijentaciji mikrotubula. S obzirom da su i istegnuće motora i položaji mikrotubula stohastičke varijable, proces vezanja motora konstruiramo tako da svakom malom vremenskom intervalu $[t, t + \Delta t]$

pridružimo vjerojatnost zakvačivanja $p_a(\Delta t) = k_a(\mathbf{y})\Delta t$, te zatim uzmemo limes $\Delta t \rightarrow 0$. Označimo sad s t_1 trenutak u kojem se motor vezao za oba mikrotubula. U tom trenutku imamo $\varepsilon = 1$, te se sad on može u nekom budućem trenutku $t_2 > t_1$ odvezati. Odvezivanje motora modeliramo kao Poissonov proces jer za stopu odvezivanja k_{d0} i ovdje smatramo da je konstantna. Vrijeme čekanja za Poissonov proces je eksponencijalno raspodjeljena nasumična varijabla, što u našem slučaju znači $(t_2 - t_1) \sim \text{Exp}(k_{d0})$. U trenutku t_2 motor ponovno postaje otkvačen, odnosno $\varepsilon = 0$, a sljedeći događaj je zakvačivanje u trenutku $t_3 > t_2$. Ovakvu konstrukciju možemo ponavljati proizvoljno mnogo puta tako da svi trenutci s neparnim indeksima $t_3, t_5, \dots, t_{2j-1} \dots$ predstavljaju j -ti događaj vezanja motora, a vremena s parnim indeksima $t_4, t_6, \dots, t_{2j} \dots$ j -ti događaj odvezivanja. Drugim riječima, definiranjem vremenskih točaka $0 < t_1 < t_2 \dots < t_{2j-1} < t_{2j} \dots$ kao diskretnog stohastičkog procesa, u potpunosti smo definirali stanje motora $\varepsilon(t)$, jer vrijedi $\varepsilon = 1$ u intervalima $t_{2j-1} < t < t_{2j}$, i $\varepsilon = 0$ inače. U slučaju kad je početno stanje $\varepsilon(0) = 1$, vremenske točke su $0 < t_2 < t_3 \dots$, a sve ostalo ostaje isto. Osim stanja motora ε , kako bismo dobili njegov doprinos ukupnom momentu sile trebamo i odrediti koordinate mjesta gdje je vezan tako da rješavamo jednadžbu (4.6) u svakom intervalu $t_{2j-1} < t < t_{2j}$ s početnim uvjetima $\mathbf{r}_{1,2}(t_{2j-1})$. Početni uvjeti se određuju tako da je istegnuće motora u trenutku zakvačivanja, $\mathbf{y}(t_{2j-1})$, nasumična varijabla koja ima Boltzmannovu raspodjelu.

S obzirom na se u nukleoplazmi nalazi N_0 motora, gore opisan postupak moramo ponoviti za svaki od njih, tako da dobivamo vremena vezanja $\{t_{2j-1,i}\}$, te vremena odvezivanja $\{t_{2j,i}\}$ za svaki motor. Ukupni broj vezanih motora je također nasumični proces, a dobiva se iz izraza $N(t) = \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i$. Treba imati na umu da vremena vezanja za različite motore ovise o stanjima i koordinatama svih drugih motora, a vezanje dolazi iz ovisnosti o geometriji mikrotubula u stopi zakvačivanja $k_{on}(\mathbf{y}_i)$ i projekciji sile $\mathbf{f}_{1,2,i} \cdot \hat{\mathbf{r}}_{1,2}$ u jednadžbi (4.6).

2.4.3 Rješenja modela

Kako bismo dobili kako se mijenjaju orijentacije mikrotubula u vremenu, ponovno koristimo sferne koordinate, tako da vektore orijentacije prametriziramo preko polarnih i azimutalnih kutova, $\theta_{1,2}$ i $\varphi_{1,2}$ (kutovi na slici 6.1), pa dobivamo

$\hat{\mathbf{r}}_{1,2}(\theta_{1,2}, \phi_{1,2}) = (\sin \theta_{1,2} \cos \phi_{1,2}, \sin \theta_{1,2} \sin \phi_{1,2}, \cos \theta_{1,2})$. Ovaj puta i azimutalni kut igra ulogu u nastajanju svežnjeva, tako da moramo napisati jednadžbe gibanja za sva četiri kuta,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \theta_{1,2} \\ \phi_{1,2} \end{bmatrix} = \frac{D}{k_B T} \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i r_{1,2;i} (\mathbf{F}_{1,2;i} \circ \mathbf{a}_{1,2}) + D \begin{bmatrix} \cot \theta_{1,2} \\ 0 \end{bmatrix} \\ + \sqrt{2D_{1,2}} \begin{bmatrix} \eta_{\theta;1,2} \\ \csc \theta_{1,2} \eta_{\phi;1,2} \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Ovdje smo, kako bismo pojednostavili zapis, u prvom članu s desne strane razdvojili član koji sadrži ovisnost o položaju motora,

$$\mathbf{F}_{1,2;i} \equiv k \begin{bmatrix} (r_{2,1;i} - L_{2,1}) \\ r_{2,1;i} \end{bmatrix} \left(1 - \frac{y_{0,m}}{y_i}\right), \quad (4.8)$$

i član koji sadrži samo kutne varijable,

$$\mathbf{a}_{1,2} \equiv \begin{bmatrix} (\sin \theta_{2,1} \cos \theta_{1,2} \cos(\phi_{1,2} - \phi_{2,1}) - \cos \theta_{2,1} \sin \theta_{1,2}) \\ \sin \theta_{2,1} \sin(\phi_{2,1} - \phi_{1,2}) \end{bmatrix}. \quad (4.9)$$

Ovdje izraz $(\mathbf{F}_{1,2;i} \circ \mathbf{a}_{1,2})$ predstavlja Hadamard umnožak, u kojem se množe elementi s istim indeksom. U jednadžbi (4.8), $L_{2,1}$ predstavlja točke na mikrotubulima u kojima je njihova udaljenost najmanja.

Kako bismo riješili jednadžbu (4.7) u ovakvom obliku i dobili putanje mikrotubula, potrebno je znati stanja i položaje svakog motora u nukleoplazmi. Iako je u principu moguće simulirati svaki motor koristeći Monte Carlo metode, na primjer kao u (Blackwell et al., 2017a; Johann et al., 2015), taj pristup zahtjeva velik broj operacija u svakom vremenskom koraku, te nije pogodan za ovako jednostavan sustav. Za razliku od slučaja nastajanja paralelnih svežnjeva, ovdje ne možemo koristiti adijabatsku aproksimaciju za raspodjelu motora jer su krakovi sile motora veliki, tako da i prijelazna stanja upravo spojenih motora imaju značajan doprinos ukupnom momentu sile. Međutim, i dalje nam je za određivanje momenta sile jedino važan kolektivni efekt svih spojenih motora, a ne ponašanje svakog motora pojedinačno, pa ćemo sumu u jednadžbi (4.7) izraziti preko srednje vrijednosti položaja svih spojenih motora,

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \theta_{1,2} \\ \phi_{1,2} \end{bmatrix} = D \left(-\frac{\tau_{1,2;\text{SPB}}}{k_B T} \begin{bmatrix} \sin \theta_{1,2} \cos \theta_{1,2} \\ 0 \end{bmatrix} \right. \\
+ \frac{\tau_r}{k_B T} \begin{bmatrix} \cos \theta_{1,2} \sin \theta_{2,1} \cos(\phi_1 - \phi_2) - \sin \theta_{1,2} \cos \theta_{2,1} \\ \sin \theta_{2,1} \sin(\phi_{2,1} - \phi_{1,2}) \csc \theta_{1,2} \end{bmatrix} \\
\left. + \begin{bmatrix} \cot \theta_{1,2} \\ 0 \end{bmatrix} \right) + \sqrt{2D_{1,2}} \begin{bmatrix} \eta_{\theta;1,2} \\ \csc \theta_{1,2} \eta_{\phi;1,2} \end{bmatrix}, \quad (4.10)
\end{aligned}$$

Iznosi momenata sila su $\tau_r = k \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i r_{1,i} r_{2,i}$ i $\tau_{1,2;\text{SPB}} = k d_{\text{SPB}} \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i r_{1,2,i}$. Druga suma je linearna u $r_{1,2,i}$, što znači da ju možemo izvrijedniti bez da točno znamo raspodjelu svih motora, nego samo prosječni položaj $\bar{r}_{1,2}$ i ukupni broj spojenih motora, N , odnosno $\sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i r_{1,2,i} = N \bar{r}_{1,2}$. Motivirani ovim, uvodimo aproksimaciju koja nam olakšava evaluiranje prve sume. Motori su mnogo manji od mikrotubula, i vežu samo ako su mikrotubuli dovoljno blizu jedan drugom. Ako s $L_{1,2}$ označimo točke na mikrotubulima koje su najbliže jedna drugoj, tada su upravo te točke dobra aproksimacija za krak sile, odnosno možemo koristiti $\tau_{1,2;r} \approx k L_{1,2} N \bar{r}_{1,2}$. Na ovaj način smo sve članove u jednadžbama gibanja napisali preko broja spojenih motora i prosječne vrijednosti njihovih koordinata, što znači da smo sustav od $3N_0$ jednadžbi (dvije koordinate položaja i stanje za svaki motor) sveli na dvije jednadžbe za prosječne koordinate, te jednu jednadžbu za broj spojenih motora.

Prije nego nastavimo, treba odrediti točke $L_{1,2}$. Po definiciji, to su točke na mikrotubulima koje minimiziraju udaljenost između mikrotubula, odnosno $|\mathbf{y}(L_1, L_2)| = y_{\min}$. Kao što se često radi u ovakvim problemima, koristimo činjenicu da je dovoljno minimizirati kvadrat udaljenosti, a uvrštavanjem izraza za udaljenost preko polarnih i azimutalnih kutova dobivamo

$$\begin{aligned}
(L_1, L_2) = \underset{r_1, r_2}{\operatorname{argmin}} [r_1^2 + r_2^2 - 2r_1 r_2 \cos \alpha - 2d_{\text{SPB}} r_1 \cos \theta_1 \\
+ 2d_{\text{SPB}} r_2 \cos \theta_2 + d_{\text{SPB}}^2]. \quad (4.11)
\end{aligned}$$

Uvjet da se te točke nalaze na mikrotubulima se formalizira kao četiri uvjeta na koordinate

$$0 < r_1 < R_1, \quad (4.12a)$$

$$0 < r_2 < R_2. \quad (4.12b)$$

U općenitom slučaju se ovaj problem rješava korištenjem Karush-Kuhn-Tucker algoritma, no to se svodi na sustav od deset uglavnom nelinearnih jednadžbi. S druge strane, traženje rješenja čisto numeričkom metodom je procesorski zahtjevno. Međutim, koristeći geometriju sustava i analitičke metode možemo svesti ovaj problem na provjeravanje samo nekolicine kandidata za potencijalno rješenje. Pronađimo prvo koordinate L_1^* i L_2^* koje su rješenje problema bez ograničenja, koje dobivamo iz jednadžbe $\nabla y^2|_{L_1^*, L_2^*} = 0$, gdje je $\nabla = (\partial/\partial r_1, \partial/\partial r_2)$ operator gradijenta. Ako $L_1 = L_1^*$ i $L_2 = L_2^*$ zadovoljavaju uvjete (6.9), tada smo gotovi i to su rješenja. Ako su obje točke veće od pripadnih mikrotubula, odnosno $L_1^* > R_1$ i $L_2^* > R_2$, tada su najbliže točke upravo vrhovi mikrotubula, tj. rješenje je (R_1, R_1) . Analogno, ako $L_1^* < 0$ i $L_2^* < 0$, rješenje je $(0,0)$. U svim ostalim slučajevima su, rješenje je ili $(R_2 \cos \alpha + d_{\text{SPB}} \cos \theta_1, R_2)$ ili $(R_1, R_1 \cos \alpha - d_{\text{SPB}} \cos \theta_2)$, te treba numerički izračunati udaljenost i odabrati onaj par za koji je ona manja.

Preostaje nam izračunati broj spojenih motora, te njihove prosječne koordinate. Počnimo s brojem spojenih motora, $N(t) = \sum_{i=1}^{N_0} \varepsilon_i$. Koristit ćemo pristup koje smo diskutirali u poglavlju 1.2.3, tako da ćemo broj spojenih motora shvatiti kao stanje sustava koje može imati vrijednosti $N \in \{0, \dots, N_0\}$ i vjerojatnost p_N . U svakom malom intervalu Δt , može se ili jedan od N motora otkvačiti s vjerojatnošću $k_{\text{off}} N \Delta t$ ili se jedan od $N_0 - N$ motora može zakvačiti s vjerojatnošću $k_{\text{on}} (N_0 - N) \Delta t$. Uzimanjem limesa $\Delta t \rightarrow dt$, osiguravamo da nisu mogući višestruki događaji jer je njihova vjerojatnost reda $\Delta t^2 \rightarrow 0$. Sad možemo vjerojatnost svakog stanja izraziti preko Master jednadžbe, odnosno imamo sustav $N_0 + 1$ jednadžbi koje opisuju vjerojatnost stanja sustava,

$$\frac{dp_N}{dt} = k_a(N_0 - N - 1)p_{N-1} + k_{d0}(N + 1)p_{N+1} - (k_a(N_0 - N) + k_{d0}N)p_N. \quad (4.13)$$

Zatim, pretpostavimo da je u svakom trenutku mnogo više slobodnih motora u nukleoplazmi nego onih koji su spojeni za mikrotubule, $N_0 \gg N$. To znači da se zakvačivanjem broj slobodnih motora ne mijenja značajno, odnosno $N_0 - N \approx N_0$. Formalno, uzimamo limese $\lim_{N_0 \rightarrow \infty} k_a \rightarrow 0$, no da bi se motori uopće mogli zakvačivati zahtijevamo da umnožak $c = k_a N_0$ bude konačan. Time se jednadžba (4.13) pojednostavljuje u

$$\frac{dp_N}{dt} = cp_{N-1} + k_{d0}(N+1)p_{N+1} - (c + k_{d0}N)p_N. \quad (4.14)$$

Stopa kojom se motori vežu ovisi o geometriji mikrotubula, odnosno o broju slobodnih motora koji imaju dovoljno veliko istegnuće da bi se mogli vezati s obje glave. S obzirom da je raspodjela istegnuća motora u nukleoplazmi dana Boltzmannovom raspodjelom, efektivni broj dostupnih motora je

$$c = \frac{N_{\text{ef}}}{\sin \alpha} e^{-\frac{ky_{\min}^2}{2k_B T}}, \quad (4.15)$$

gdje konstantu $N_{\text{ef}} \propto N_0$ nazivamo efektivni broj motora. Konačno, s obzirom da nas zanima režim kada je značajan broj motora spojenih na mikrotubule, odnosno $N \gg 1$, $N(t)$ možemo aproksimirati kontinuirano varijablom i napisati Langevinovu jednadžbu,

$$\frac{dN}{dt} = c - k_{d0}N + \sqrt{c + k_{d0}N}\eta_N. \quad (4.16)$$

Ovu jednadžbu smo dobili tako da smo zadržali samo prva dva momenta u raspodjeli p_N , koji su redom očekivana vrijednost $E[N] = \sum_{N=0}^{\infty} N p_N$ i varijanca, $\text{var}(N) = \sum_{N=0}^{\infty} N^2 p_N - (E[N])^2$, koje računamo izravno iz jednadžbe (4.14).

Preostaje još samo izračunati srednje vrijednosti koordinata motora. Kao i u slučaju paralelnih svežnjeva, koristimo pomoćne koordinate koje imaju međusobno nezavisne jednadžbe gibanja, $u = (r_1 + r_2)/2$ i $w = (r_1 - r_2)/2$. Uvrštavanjem u jednadžbu (4.6) i koristeći definiciju prosječne vrijednosti $\bar{u} = \sum_{i=1}^N u_i / N$ i $\bar{w} = \sum_{i=1}^N w_i / N$ dobivamo sustav nezavisnih jednadžbi

$$\frac{d\bar{u}}{dt} = -\frac{2kv_0}{f_0}\bar{u}\sin^2\frac{\alpha}{2} + v_0\left[1 + \frac{kL}{2f_0}(\cos\theta_1 - \cos\theta_2)\right] + \sqrt{\frac{D_v}{N}}\eta_u, \quad (4.17a)$$

$$\frac{d\bar{w}}{dt} = -\frac{2kv_0}{f_0}\bar{w}\cos^2\frac{\alpha}{2} + v_0\left[1 + \frac{kL}{2f_0}(\cos\theta_1 + \cos\theta_2)\right] + \sqrt{\frac{D_v}{N}}\eta_w. \quad (4.17b)$$

Ove jednadžbe opisuju promjenu prosječnih koordinata u režimu kad postoje samo kontinuirani pomaci. Međutim, u slučaju kad promatramo nastajanje antiparalelnih svežnjeva, treba uzeti u obzir i promjene uzrokovane zakvačivanjem i otkvačivanjem motora. Kao i kad smo računali broj spojenih motora, diskretne procese ćemo aproksimirati kontinuiranim tako da odredimo prva dva momenta njihove raspodjele. Ti momenti se računaju tako da prvo izračunamo očekivanje i varijancu njihovih

doprinosu u malom intervalu Δt . Pogledajmo prvo doprinos varijabli \bar{u} zbog zakvačivanja jednog motora. Pretpostavimo da se u malom intervalu zakvačilo n_a motora. Tada je očekivana promjena srednje vrijednosti $\Delta\bar{u} = \bar{u}(t + \Delta t) - \bar{u}(t)$ zbog spajanja motora

$$E[\Delta\bar{u}]_a = \sum_{n_a=0}^{\infty} E[\Delta\bar{u}|n_a] p(n_a). \quad (4.18)$$

S obzirom da želimo uzeti limes $\Delta t \rightarrow 0$, uzimamo $p(n_a \geq 2) = 0$, jer su reda Δt^2 ili manji. S druge strane, $E[\Delta\bar{u}|n_a = 0] = 0$, pa dobivamo $E[\Delta\bar{u}]_a = E[\Delta\bar{u}|n_a = 1]p(n_a = 1)$. Vjerojatnost da se u intervalu Δt spoji jedan motor je $p(n_a = 1) = c\Delta t$, pa dobivamo

$$E[\Delta\bar{u}|n_a = 1] = E\left[\frac{\sum_i u_i + u_0}{N+1} - \frac{\sum_i u_i}{N}\right], \quad (4.19a)$$

$$E[\Delta\bar{u}|n_a = 1] = \frac{E[u_0] - \bar{u}(t)}{N+1}, \quad (4.19b)$$

gdje je u_0 koordinata novog motora. Znamo da je u trenutku spajanja istegnuće motora nasumična varijabla s Boltzmannovom raspodjelom, pa je njegova očekivana vrijednost $L_u = (L_1 + L_2)/2$, a standardna devijacija $\sigma_u = \sqrt{k_B T}/2 \sin(\alpha/2)$. Uvrštavanjem dobivamo

$$E[\Delta\bar{u}]_a = \frac{L_u - \bar{u}}{N+1} c\Delta t. \quad (4.19c)$$

Varijancu računamo kao $\text{var}(\Delta\bar{u}) = E[(\Delta\bar{u})^2]$, jer smo zanemarili $(E[\Delta\bar{u}])^2 \propto (\Delta t)^2$, a za doprinos od spajanja motora ona iznosi

$$\text{var}(\Delta\bar{u})_a = \frac{(\bar{u} - L_u)^2 + \sigma_u^2}{(N+1)^2} c\Delta t. \quad (4.20)$$

U ovoj aproksimaciji su i očekivana vrijednost i varijanca proporcionalni s Δt , što zadovoljava definiciju difuzijskog procesa (vidi poglavlje 1.2.6), a ako zanemarimo više momente i uzmemo limes $\Delta t \rightarrow dt$ možemo napisati Ito jednadžbu za doprinos koordinati \bar{u} zbog spajanja motora,

$$d\bar{u}|_a = c \frac{L_u - \bar{u}}{N+1} dt + \sqrt{c \frac{(\bar{u} - L_u)^2 + \sigma_u^2}{(N+1)^2}} dW_{u,a}, \quad (4.21)$$

gdje je $dW_{u,a}$ infinitezimalni Wienerov pomak za koji standardno vrijedi $\langle dW_i, dW_j \rangle = \delta_{ij} dt$. Istim postupkom dobivamo za doprinos koordinati \bar{w}

$$d\bar{w}|_a = c \frac{L_w - \bar{w}}{N+1} dt + \sqrt{c \frac{(\bar{u} - L_w)^2 + \sigma_w^2}{(N+1)^2}} dW_{w,a}, \quad (4.22)$$

gdje $L_w = (L_1 - L_2)/2$ i $\sigma_w = \sqrt{k_B T}/2 \cos(\alpha/2)$. Na sličan način računamo i doprinose zbog odvajanja motora. Lako je vidjeti da $E[\Delta\bar{u}]_d = 0$, jer micanjem nasumičnog člana ansambla ne mijenjamo očekivanu vrijednost raspodjele dok god je izbor bilo kojeg elementa jednako vjerojatan. Varijancu računamo iz drugog momenta doprinosa $\Delta\bar{u}$ uz uvjet da smo maknuli j -ti motor, $E[(\Delta\bar{u})^2|j]_d$, a koristimo izraz

$$E[\Delta\bar{u}^2]_d = \sum_{j=1}^N E[(\Delta\bar{u})^2|j]_d p_j. \quad (4.23)$$

Vjerojatnost odvajanja je jednaka za svaki motor i iznosi $p_j = k_{\text{off}}\Delta t$, pa sumiranjem po svim motorima dobivamo

$$\text{var}(\Delta\bar{u})_d = \sum_{j=1}^N E \left[\frac{\sum_{i \neq j} u_i}{N-1} - \frac{\sum_i u_i}{N} \right] k_{d0} \Delta t, \quad (4.24a)$$

$$\text{var}(\Delta\bar{u})_d = \frac{k_{d0} \Delta t}{(N-1)^2} \sum_{j=1}^N (\bar{u} - u_j)^2. \quad (4.24b)$$

Suma u jednadžbi (4.24b) se može odrediti iz raspodjele spojenih motora jer vrijedi $\sum_{j=1}^N (\bar{u} - u_j)^2 = N \text{var}(u)$. Međutim, ne želimo eksplicitno računati raspodjelu motora. Ovdje koristimo činjenicu da je karakteristično vrijeme potrebno da spojeni motori izgube informaciju o početnom stanju iznosi $f_0/kv_0 \sin^2(\alpha/2)$, što smo dobili iz jednadžbe (4.17a). To je vrijeme usporedivo s očekivanim vremenom koje prođe između događaja, $1/k_{d0}$, pa koristimo varijancu stacionarne distribucije (vidi poglavlje 1.2.9), $\text{var}(u) = f_0 D_v / 8kv_0 \sin^2(\alpha/2)$. S obzirom da doprinos zbog otkvačivanja ima samo stohastičku komponentu, imamo

$$d\bar{u}|_d = \sqrt{\frac{Nk_{d0} \text{var}(u)}{(N-1)^2}} dW_{u,d}. \quad (4.25)$$

Analogno za \bar{w} ,

$$d\bar{w}|_d = \sqrt{\frac{Nk_{d0} \text{var}(w)}{(N-1)^2}} dW_{w,d}, \quad (4.26)$$

gdje je $\text{var}(w) = f_0 D_v / 8kv_0 \cos^2(\alpha/2)$. Kombiniranjem doprinosa zbog kontinuiranih pomaka (jednadžbe (4.17a,b)), vezanja (jednadžbe (4.21) i (4.22)), te odvezivanja (jednadžbe (4.25) i (4.26)) dobivamo

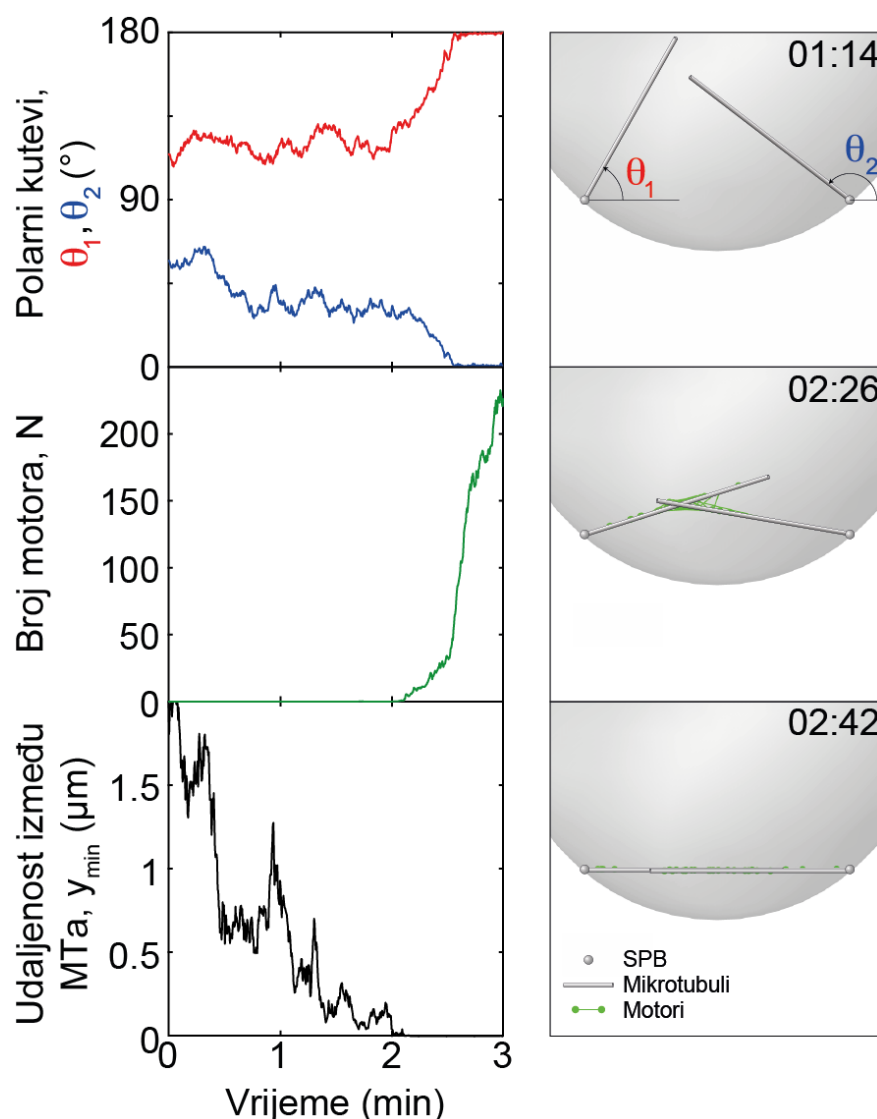
$$\begin{aligned}
\frac{d\bar{u}}{dt} = & -\frac{2kv_0}{f_0} \bar{u} \sin^2 \frac{\alpha}{2} + v_0 \left[1 + \frac{kd_{\text{SPB}}}{2f_0} (\cos \theta_1 - \cos \theta_2) \right] + \sqrt{\frac{D_v}{N}} \eta_u \\
& + \frac{L_u - \bar{u}}{N+1} c + \frac{1}{N+1} \sqrt{c \left((L_u - \bar{u})^2 + \frac{k_B T}{4k \sin^2 \frac{\alpha}{2}} \right)} \eta_{u;a} \\
& + \frac{1}{|N-1|} \sqrt{\frac{k_{d0} N f_0 D_v}{8k v_0 \sin^2 \frac{\alpha}{2}}} \eta_{u;d},
\end{aligned} \tag{4.27a}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d\bar{w}}{dt} = & -\frac{2kv_0}{f_0} \bar{w} \cos^2 \frac{\alpha}{2} + v_0 \left[1 + \frac{kd_{\text{SPB}}}{2f_0} (\cos \theta_1 + \cos \theta_2) \right] + \sqrt{\frac{D_v}{N}} \eta_w \\
& + \frac{L_w - \bar{w}}{N+1} c + \frac{1}{N+1} \sqrt{c \left((L_w - \bar{w})^2 + \frac{k_B T}{4k \cos^2 \frac{\alpha}{2}} \right)} \eta_{w;a} \\
& + \frac{1}{|N-1|} \sqrt{\frac{k_{d0} N f_0 D_v}{8k v_0 \cos^2 \frac{\alpha}{2}}} \eta_{w;d}.
\end{aligned} \tag{4.27b}$$

Nakon rješavanja ovih jednadžbi transformiramo koordinate natrag $\bar{r}_{1,2} = \bar{u} \pm \bar{w}$, te uvrštavamo zajedno s jednadžbom za broj spojenih motora u jednadžbu gibanja za kutove (4.10). Valja imati na umu da ovakva kontinuirana aproksimacija diskretnih procesa vrijedi samo kad je mnogo spojenih motora, no to nije problem jer su tipične sile u jednadžbi (4.10) male u odnosu na šum za $N < 10$. Prednost ovakvog pristupa očita je u činjenici da se rješenja ovih jednadžbi mogu dobiti jednostavnom Euler-Maruyama shemom na kućnim računalima, dok se za modele koji uključuju Monte-Carlo simulacije svakog motora i mikrotubula moraju koristiti radne stanice s mnogo jezgri. Korištenje ovog modela omogućuje jednostavno i iscrpno istraživanje parametarskog prostora.

2.4.4 Rješavanje modela i predviđanja na mezoskopskoj skali

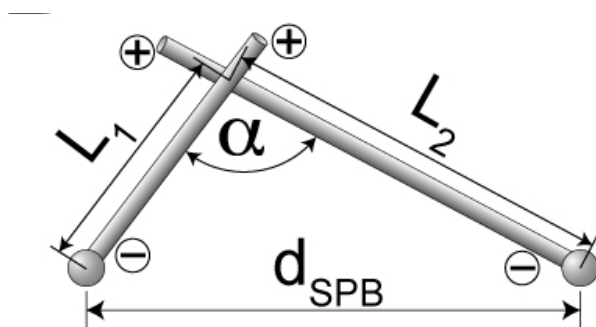
Dobivene jednadžbe smo rješavali numerički kako bismo simulirali putanje mikrotubula. Kako bismo se uvjerali da te jednadžbe zaista daju antiparalelne svežnjeve, na slici 6.2 je prikazana tipična putanja.



Slika 6.2. Putanje mikrotubula u simulacijama. Na lijevoj strani su prikazane ovisnosti kutova (gore), broja spojenih motora (sredina) i minimalna udaljenost između mikrotubula (dolje). Na desnoj strani su ilustracije trenutne konfiguracije za odabrane vremenske točke (vrijeme je min:s). Velika siva kugla predstavlja staničnu ovojniciu.

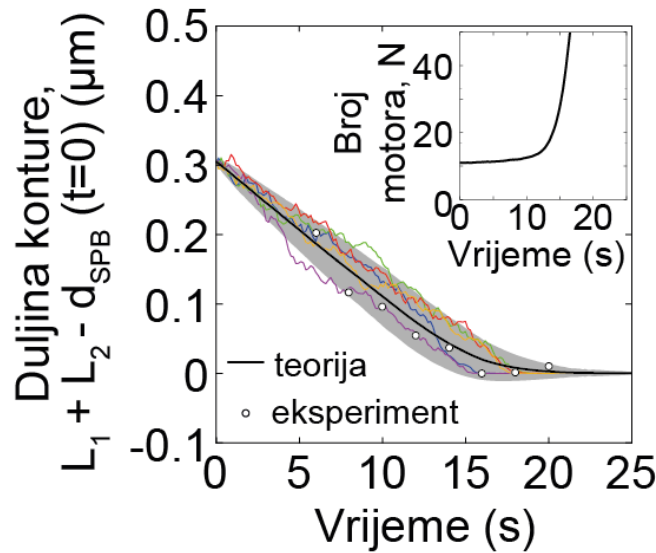
Kao i kod nastajanja paralelnih svežnjeva, vidimo da, ako krenemo iz proizvoljnog početnog kuta, mikrotubuli prvo vrše potpuno nasumično kutno gibanje dok ne dođu blizu jedan drugom (slika 6.2 gore lijevo), nakon čega se nakupljaju motori (slika 6.2 sredina lijevo) koji dovode do nastanka stabilnog svežnja, te međusobna udaljenost mikrotubula ostaje mala (slika 6.2 dolje lijevo), što potvrđuje da je formiran svežanj. Međutim, za razliku od paralelne konfiguracije, gdje je svežanj nastao naglo odmah nakon prvog kontakta, nastajanje antiparalelnog svežnja je postepeno, odnosno postoji nezanemarivo vrijeme pri kojem se mikrotubuli gibaju usmjereno. Naša hipoteza je da ovo usmjereno gibanje upravo odgovara situaciji u kojoj motori vuku mikrotubule

jedan po drugom. S obzirom da motori imaju konačnu brzinu v_0 , očekujemo da tipično vrijeme koje prođe od kad su mikrotubuli došli u kontakt do formiranja svežnja bude proporcionalno brzini motora, te da je brzina gibanja jednog mikrotubula u odnosu na drugi bude približno konstantna.



Slika 6.3. Skica definicije duljine konture. Simboli “+” i “-” označavaju plus i minus kraj mikrotubula, a α je kut među njima. Duljine L_1 i L_2 predstavljaju udaljenosti između polova i točke u kojoj se mikrotubuli preklapaju.

Kako bismo provjerili tu hipotezu i usporedili s eksperimentalnim rezultatima, definiramo duljinu konture mikrotubule $L_1 + L_2$, koja predstavlja ukupnu duljinu duž mikrotubula od jednog pola, do sjecišta mikrotubula, te zatim do drugog pola (slika 6.3). Vrijeme od kad mikrotubuli dođu u kontakt do trenutka kad su oni paralelni, odnosno $L_1 + L_2 \approx d_{\text{SPB}}$ definira mezoskopsku skalu sustava. Kako bismo usporedili teorijska predviđanja s eksperimentalnim mjerenjima na toj skali, napravili smo 1000 simulacija nastajanja antiparalelnog svežnja u kojima smo koristili tipične parametre sustava (Tablica 1), a početni položaj je uvijek bila konfiguracija u kojoj su mikrotubuli već u kontaktu.



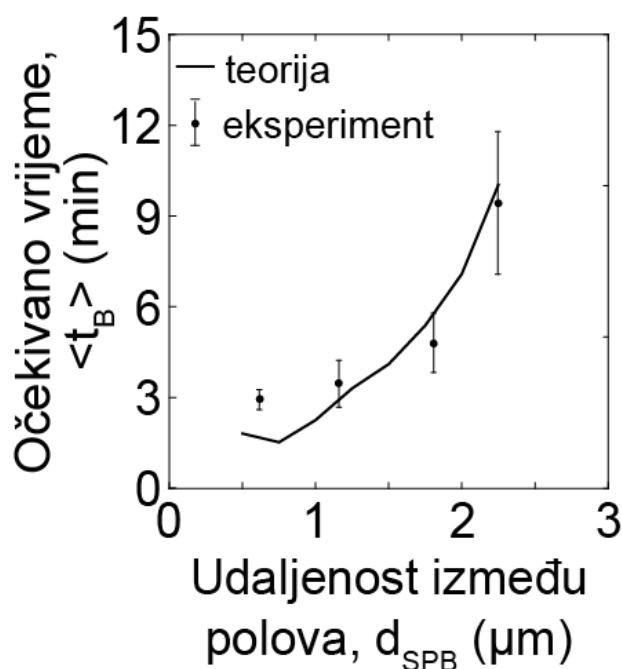
Slika 6.4. Duljina konture u ovisnosti o vremenu. Linije u boji predstavljaju pojedinačne putanje, crna linija je njihov prosjek, siva regija je standardna pogreška teorijskih rezultata, a bijele točke su prosječne vrijednosti eksperimentalnih mjerenja. Umetak prikazuje broj spojenih motora u simulacijama s istom konvencijom boja.

Na slici 6.4 se vidi nekoliko tih simulacija (u boji), kao i prosjek svih simulacija (crno). Očekivana vrijednost mjerenja duljine konture u eksperimentima je prikazana bijelim točkama, te vidimo dobro poklapanje s teorijskim predviđanjima. I teorija i eksperiment pokazuju da se kontura smanjuje brzinom približno jednakom brzini kretanja motora, v_0 .

2.4.5 Predviđanja modela na makroskopskoj skali

Mjerenje duljine konture pokazuje da naš model dobro opisuje biološki sustav na mezoskopskoj skali, no također nas je zanimalo može li reproducirati njegovo makroskopsko ponašanje. Makroskopska skala je, kao i kod paralelnih svežnjeva definirana očekivanim vremenom potrebnim da mikrotubuli, koji počinju od nasumične konfiguracije dane izotropnom raspodjelom kutova, dođu u antiparalelnu konfiguraciju. Kako bismo usporedili teorijska predviđanja s eksperimentalnim mjerenjima, napravili smo, za svaku vrijednost duljine diobenog vretena, 3000 simulacija dinamike mikrotubula s parametrima danim u Tablici 2. Početni kutovi su bili nasumični, kao i njihova duljina za koju smo pretpostavili eksponencijalnu raspodjelu (vidi poglavlje 2.2.4). Za očekivano vrijeme nastajanja svežnja u eksperimentu smo ponovno koristili $\langle t_B \rangle = t_{\text{exp}}/n$. Međutim, u eksperimentu postoji nekoliko (oko 5 na svakom polu) mikrotubula koje mogu potencijalno napraviti

antiparalelni svežanj, a nakon što se diobenno vreteno formira više nije moguće jasno raspoznati jesu li svežnjevi koji nastaju nakon toga novi antiparalelni svežnjevi, ili paralelno vezanje mikrotubula i diobenog vretena (kao na slici 2.3). Zbog toga smo u ukupnom vremenu t_{exp} koristili samo vremena nastanka prvog svežnja. Kako bismo uzeli u obzir činjenicu da postoji više mikrotubula koji mogu napraviti svežanj, mikrotubule u simulacijama smo grupirali u 25 parova (koji predstavljaju sve kombinacije antiparalelnih svežnjeva koji se mogu napraviti ako postoje 5 mikrotubula na svakom polu), te uzeli samo najkraće vrijeme od tih 16, dok smo druge zanemarili. S obzirom da gledamo vrijeme kad nastane prvi antiparalelni svežanj, možemo tvrditi da smo mjerili vrijeme formacije diobenog vretena u kvascu. Rezultati simulacija u ovisnosti o udaljenosti između polova su prikazani punom crtom na slici 6.5, a točke predstavljaju podatke dobivene iz eksperimenta. I u ovom slučaju dobivamo dobro poklapanje u vremenima nastanka svežnjeva, što implicira da naš model dobro opisuje i makroskopsko ponašanje ovog sustava.



Slika 6.5. Očekivano vrijeme nastajanja prvog antiparalelnog svežnja u teoriji (linija) i eksperimentu (točke, margine su standardna pogreška; $n = 151$).

3 Zaključak i diskusija

Rezultati ovog rada sugeriraju da su difuzivno gibanje mikrotubula oko polova i kratkodosežne sile koje uzrokuju vezivni proteini vezani na oba mikrotubula dovoljni

za formiranje stabilnih svežnjeva mikrotubula. Teorijski model pokazuje da mikrotubul koji na početku raste u proizvoljnom smjeru koristi nasumično pivotiranje kako bi pretražio prostor i došao u kontakt s drugim mikrotubulom, a kad su oni dovoljno blizu jedan drugom, dolazi do nakupljanja motora koji onda omogućavaju usmjereno gibanje prema paralelnoj ili antiparalelnoj konfiguraciji. Naš pristup je uglavnom analitički, koristeći prigodne aproksimacije dobili smo Langevinove jednadžbe za gibanje mikrotubula u kojima se pojavljuje samo raspodjela odnosno ukupni broj i srednji položaj vezivnih proteina, a ne mikroskopsko gibanje pojedinačnih vezivnih proteina. Prednost ovog pristupa je numerička efikasnost – umjesto Monte Carlo simulacije svakog motora, kojih u nukleoplazmi ima stotine, rješavamo sustav od nekoliko jednadžbi numeričkom integracijom. Što takav pristup gubi u detaljima o trenutnom mikroskopskom stanju sustava, to i više nego nadoknađuje mogućnošću brzog pretraživanja parametarskog prostora i numeričkom stabilnošću. Ova metoda je komplementarna detaljnim simulacijama, npr. (Blackwell et al., 2017a; Nedelec, 2002; Ward et al., 2014), koje daju više informacija o mikroskopskom stanju sustava i time uzimaju u obzir doprinose višeg reda koje mi zanemarujemo.

Naš model za nastajanje paralelnih svežnjeva pokazuje da su nasumično kutno gibanje mikrotubula i elastične interakcije uzrokovane vezivnim prteinima dovoljne da bi u konačnom vremenu nastali paralelni svežnjevi. Nasumično gibanje je nužno kako bi mikrotubuli došli dovoljno blizu jedan drugom, jer su vezivni protein značajno manji od mikrotubula, tako da su interkcije koje oni uzrokuju kratkodosežne. Sami vezivni protein su nužni zbog toga što inače nema što držati microtubule u paralelnoj konfiguraciji. Nadalje, model predviđa da za nastajanje paralelnih svežnje nisu potrebni vezivni proteini koji se gibaju u preferiranom smjeru, odnosno motori, nego oni mogu biti pasivni. Dobivena analitička rješenja za efektivni potencijal interakcije uzrokovan vezivnim proteinima omogućava nam temeljito istraživanje parametarskog prostora, te dobivamo granične koncentracije vezivnih proteina i duljine mikrotubula za koje su svežnjevi koji nastaju stabilni. U slučaju kad se radi o motorima, dobivamo značajno različita ponašanja ovisno o kakvom se tipu motora radi. Motori koji se kreću prema plus kraju mikrotubula stvaraju značajno veće privlačne momente sila između mikrotubula nego jednak broj pasivnih mikrotubula jer se nakupljaju bliže vrhovima mikrotubula gdje su jače rastegnuti. Ako se motori kreću prema minus kraju mikrotubula, tada oni ne stvaraju privlačne

momente jer se nakupljaju na polovima. Slika koju daje naša teorija je u skladu s eksperimentima svjetlosnom mikroskopijom na kvascu *S. pombe* u kojima se vidi dinamika pojedinačnih mikrotubula i nastajanje svežnjeva. Iz eksperimenata na perturbiranim stanicama u kojima smo eliminirali pasivne vezivne proteine zaključili smo da pasivni vezivni proteini koji učvršćuju lateralne veze mikrotubula značajno doprinose stopi nastajanja paralelnih svežnjeva. Međutim, svežnjevi i dalje nastaju, iako manje često, i u slučaju kad pasivnih vezivnih proteina nema, što znači da postoje i drugi proteini koji mogu omogućiti paralelno vezanje mikrotubula. Sudeći po rezultatima modela, moguće je da se radi o motorima koji se kreću prema plus kraju mikrotubula, iako to još nije potvrđeno. Konačno, zanimljiv eksperimentalni rezultat je i da se u živoj stanici ne vidi odvajanje mikrotubula nakon što se spoje u svežanj. Teorija objašnjava ovaj rezultat time što vrijeme razdvajanja mikrotubula raste izrazito brzo s koncentracijom vezivnih proteina nakon što se prođe kritična točka u kojoj su formirani svežnjevi stabilni, te to vrijeme za malo veće koncentracije postaje dulje nego cijeli process diobe stanice. Drugim riječima, ako u stanici mogu nastati stabilni svežnjevi, onda se oni neće razdvojiti, barem ne na vremenskim skalama dostupnim u in vivo mjerenjima.

S druge strane, pri formiranju antiparalelnih svežnjeva mikrotubuli koji dođu u kontakt daleko od antiparalelne konfiguracije trebaju aktivne motore koji vuku jedan mikrotubul po drugom kako bi se vezali. S obzirom da se pri nastajanju antiparalelnih svežnjeva svaki mikrotubul giba prema polu drugoga, radi se o motorima koji se kreću prema minus kraju mikrotubula. Postoje i implikacije da antiparalelni svežnjevi mogu nastati i djelovanjem pasivnih vezivnih proteina (Lamson et al., 2019; Winters et al., 2019), no to je izvan opsega ovog rada. Po uzoru na teoriju, koja daje rezultate na mezoskopskoj i makroskopskoj skali, a i zbog ograničenja razlučivosti svjetlosne mikroskopije, analizom eksperimentalnih podataka dobili smo karakteristična svojstva sustava na skalama puno većim od duljine jednog vezivnog proteina. Konkretno, uspoređivali smo vrijeme formiranja svežnjeva, odnosno diobenog vretena, te brzinu kojom se mikrotubuli kreću jedan po drugom pod utjecajem motora u eksperimentu i teoriji. Ovi podaci i po trendu i po iznosu odgovaraju predviđanjima teorijskog modela.

Ovakav pristup očito obećava, no može se proširiti uključivanjem dodatnih fenomena ili geometrija. Na primjer, poznato je da u antiparalelnim preklapima pasivni vezivni proteini stvaraju entropijske sile (Johann et al., 2015; Lansky et al.,

2015). Do sada se proučavalo kako te sile proizvode klizanje mikrotubula jedan po drugom u slučaju kad je barem jedan mikrotubul s oba kraja slobodan, i vidi se da entropijske sile djeluju tako da povećavaju duljinu preklopa, slično kao što i ekspanzija plina u klipu povećava njegov volumen. No još nitko nije proučavao kako te sile utječu na mikrotubule u slučaju kad su njihovi krajevi translacijski nepomični, a dopušta se rotacija oko njih. Također, bilo bi zanimljivo vidjeti kako bi u takvom sustavu izgledala dinamika mikrotubula pri djelovanju i pasivnih vezivnih proteina i aktivnih motora, koji imaju dobro definiran smjer gibanja bez obzira na veličinu preklopa. Zbog komplicirane geometrije i relativno dobro poznatih statističkih svojstava pasivnih vezivnih proteina u antiparalelnom preklopu, pristup analogan našem bi vjerojatno efikasno riješio ovaj problem. Osim proširenja u smjeru dodavanja novih elemenata u sustav, bilo bi zanimljivo vidjeti kakva predviđanja daje ovakav model za druge geometrije mikrotubula. Na primjer, poznato je da se mikrotubuli mogu nukleirati, ne samo na specifičnim tijelima kao što su polovi diobenog vretena ili centrosomi, nego i na drugim mikrotubulima (Goshima et al., 2008; Mahoney et al., 2006; Murata et al., 2005). Na primjer, svežnjevi kinetohornih vlakana viših sisavaca, koji mogu biti dugi i nekoliko desetaka mikrona, često nisu sastavljeni samo od lateralno vezanih mikrotubula, nego mikrotubuli kaskadno rastu jedan iz drugog. Tipičan primjer takve geometrije je diobeno vreteno u ekstraktu jajašca žabe *Xenopus*, gdje mali mikrotubuli rastu iz drugih mikrotubula s istom polarnošću (Petry et al., 2013). Kvantifikacija kutnog gibanja tih mikrotubula pristupom opisanim u ovom radu mogla bi dati bolje razumijevanje o načinu formiranja takvih struktura.

4 Reference

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. Molecular Biology of the Cell (Garland, New York, 1994). Google Scholar, 907-982.
- Baumgartner, S., and Tolic, I.M. (2014). Astral microtubule pivoting promotes their search for cortical anchor sites during mitosis in budding yeast. *PLoS One* 9, e93781.
- Blackwell, R., Edelmaier, C., Sweezy-Schindler, O., Lamson, A., Gergely, Z.R., O'Toole, E., Crapo, A., Hough, L.E., McIntosh, J.R., Glaser, M.A., *et al.* (2017a). Physical determinants of bipolar mitotic spindle assembly and stability in fission yeast. *Sci Adv* 3, e1601603.
- Blackwell, R., Sweezy-Schindler, O., Edelmaier, C., Gergely, Z.R., Flynn, P.J., Montes, S., Crapo, A., Doostan, A., McIntosh, J.R., Glaser, M.A., *et al.* (2017b). Contributions of Microtubule Dynamic Instability and Rotational Diffusion to Kinetochore Capture. *Biophys J* 112, 552-563.
- Braun, M., Lansky, Z., Fink, G., Ruhnnow, F., Diez, S., and Janson, M.E. (2011). Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart. *Nat Cell Biol* 13, 1259-1264.
- Brinkley, B.R., and Cartwright, J., Jr. (1971). Ultrastructural analysis of mitotic spindle elongation in mammalian cells in vitro. Direct microtubule counts. *J Cell Biol* 50, 416-431.
- Britto, M., Goulet, A., Rizvi, S., von Loeffelholz, O., Moores, C.A., and Cross, R.A. (2016). *Schizosaccharomyces pombe* kinesin-5 switches direction using a steric blocking mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E7483-E7489.
- Brugues, J., and Needleman, D. (2014). Physical basis of spindle self-organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 18496-18500.
- Burbank, K.S., Mitchison, T.J., and Fisher, D.S. (2007). Slide-and-cluster models for spindle assembly. *Current Biology* 17, 1373-1383.
- Cande, W.Z., and McDonald, K.L. (1985). In vitro reactivation of anaphase spindle elongation using isolated diatom spindles. *Nature* 316, 168-170.
- Cojoc, G., Florescu, A.M., Krull, A., Klemm, A.H., Pavin, N., Julicher, F., and Tolic, I.M. (2016). Paired arrangement of kinetochores together with microtubule pivoting and dynamics drive kinetochore capture in meiosis I. *Sci Rep* 6, 25736.

- Coy, D.L., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999). Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem* 274, 3667-3671.
- Crowder, M.E., Strzelecka, M., Wilbur, J.D., Good, M.C., von Dassow, G., and Heald, R. (2015). A comparative analysis of spindle morphometrics across metazoans. *Curr Biol* 25, 1542-1550.
- Cytrynbaum, E.N., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2003). A force balance model of early spindle pole separation in *Drosophila* embryos. *Biophys J* 84, 757-769.
- Cytrynbaum, E.N., Sommi, P., Brust-Mascher, I., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2005). Early spindle assembly in *Drosophila* embryos: role of a force balance involving cytoskeletal dynamics and nuclear mechanics. *Mol Biol Cell* 16, 4967-4981.
- Ding, R., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 120, 141-151.
- Edamatsu, M. (2014). Bidirectional motility of the fission yeast kinesin-5, Cut7. *Biochem Biophys Res Commun* 446, 231-234.
- Endow, S.A., Henikoff, S., and Soler-Niedziela, L. (1990). Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. *Nature* 345, 81-83.
- Fallesen, T., Roostalu, J., Duellberg, C., Pruessner, G., and Surrey, T. (2017). Ensembles of Bidirectional Kinesin Cin8 Produce Additive Forces in Both Directions of Movement. *Biophys J* 113, 2055-2067.
- Fong, K.K., Sarangapani, K.K., Yusko, E.C., Riffle, M., Llauro, A., Graczyk, B., Davis, T.N., and Asbury, C.L. (2017). Direct measurement of microtubule attachment strength to yeast centrosomes. *Mol Biol Cell*.
- Fu, C., Ward, J.J., Loiodice, I., Velve-Casquillas, G., Nedelec, F.J., and Tran, P.T. (2009). Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Dev Cell* 17, 257-267.
- Gardiner, C.W. (1985). *Handbook of stochastic methods*, Vol 4 (Springer Berlin).
- Gennerich, A., Carter, A.P., Reck-Peterson, S.L., and Vale, R.D. (2007). Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* 131, 952-965.
- Gennerich, A., and Vale, R.D. (2009). Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol* 21, 59-67.
- Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2008). Augmin: a protein complex required for centrosome-

- independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol* *181*, 421-429.
- Grishchuk, E.L., and McIntosh, J.R. (2006). Microtubule depolymerization can drive poleward chromosome motion in fission yeast. *Embo J* *25*, 4888-4896.
- Gron, O. (1975). Relativistic description of a rotating disk. *American Journal of Physics* *43*, 869-876.
- Hagen, I., and Yanagida, M. (1990). Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+*. *Nature* *347*, 563-566.
- Hancock, W.O., and Howard, J. (1998). Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol* *140*, 1395-1405.
- Hepperla, A.J., Willey, P.T., Coombes, C.E., Schuster, B.M., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Mukherjee, S., Fox, J., Winey, M., Odde, D.J., *et al.* (2014). Minus-end-directed Kinesin-14 motors align antiparallel microtubules to control metaphase spindle length. *Dev Cell* *31*, 61-72.
- Howard, J. (2001). Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton.
- Hsu, E.P. (2002). Stochastic analysis on manifolds, Vol 38 (American Mathematical Soc.).
- Johann, D., Goswami, D., and Kruse, K. (2015). Generation of Stable Overlaps between Antiparallel Filaments. *Phys Rev Lett* *115*, 118103.
- Kajtez, J., Solomatina, A., Novak, M., Polak, B., Vukusic, K., Rudiger, J., Cojoc, G., Milas, A., Sumanovac Sestak, I., Risteski, P., *et al.* (2016). Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. *Nat Commun* *7*, 10298.
- Kalinina, I., Nandi, A., Delivani, P., Chacon, M.R., Klemm, A.H., Ramunno-Johnson, D., Krull, A., Lindner, B., Pavin, N., and Tolic-Norrelykke, I.M. (2013). Pivoting of microtubules around the spindle pole accelerates kinetochore capture. *Nat Cell Biol* *15*, 82-87.
- Kapitein, L.C., Janson, M.E., van den Wildenberg, S.M., Hoogenraad, C.C., Schmidt, C.F., and Peterman, E.J. (2008). Microtubule-driven multimerization recruits aselp onto overlapping microtubules. *Curr Biol* *18*, 1713-1717.
- Kashina, A.S., Baskin, R.J., Cole, D.G., Wedaman, K.P., Saxton, W.M., and Scholey, J.M. (1996). A bipolar kinesin. *Nature* *379*, 270-272.
- Kawaguchi, K., and Ishiwata, S. (2001). Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science* *291*, 667-669.
- Kellogg, E.H., Howes, S., Ti, S.C., Ramirez-Aportela, E., Kapoor, T.M., Chacon, P., and Nogales, E. (2016). Near-atomic cryo-EM structure of PRC1 bound to the microtubule. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 9430-9439.

- Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-342.
- Kolomeisky, A.B., and Fisher, M.E. (2007). Molecular motors: a theorist's perspective. *Annu Rev Phys Chem* 58, 675-695.
- Kramers, H.A. (1940). Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* 7, 284-304.
- Lamson, A.R., Edelmaier, C.J., Glaser, M.A., and Betterton, M.D. (2019). Theory of Cytoskeletal Reorganization during Cross-Linker-Mediated Mitotic Spindle Assembly. *Biophys J* 116, 1719-1731.
- Lansky, Z., Braun, M., Ludecke, A., Schlierf, M., ten Wolde, P.R., Janson, M.E., and Diez, S. (2015). Diffusible crosslinkers generate directed forces in microtubule networks. *Cell* 160, 1159-1168.
- Le Guellec, R., Paris, J., Couturier, A., Roghi, C., and Philippe, M. (1991). Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular and cellular biology* 11, 3395-3398.
- Leupold, U. (1950). The inheritance of homothally and heterothally in *S. Pombe*. *Comptes rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* 24, 381-480.
- Loiodice, I., Staub, J., Setty, T.G., Nguyen, N.P., Paoletti, A., and Tran, P.T. (2005). Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 16, 1756-1768.
- Loughlin, R., Heald, R., and Nedelec, F. (2010). A computational model predicts *Xenopus* meiotic spindle organization. *J Cell Biol* 191, 1239-1249.
- Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D., and Vale, R.D. (2006). Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr Biol* 16, 564-569.
- Mastronarde, D.N., McDonald, K.L., Ding, R., and McIntosh, J.R. (1993a). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* 123, 1475-1489.
- Mastronarde, D.N., McDonald, K.L., Ding, R., and McIntosh, J.R. (1993b). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *The Journal of Cell Biology* 123, 1475-1489.
- McCully, E.K., and Robinow, C.F. (1971). Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. *J Cell Sci* 9, 475-507.
- McDonald, H.B., Stewart, R.J., and Goldstein, L.S. (1990). The kinesin-like *ncd* protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. *Cell* 63, 1159-1165.

- McDonald, K.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* 118, 369-383.
- Meyhöfer, E., and Howard, J. (1995). The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 574-578.
- Mitchison, J. (1990). My favourite cell: the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioessays* 12, 189-191.
- Moyal, J. (1949). Stochastic processes and statistical physics. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 11, 150-210.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., and Hasebe, M. (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol* 7, 961-968.
- Nedelec, F. (2002). Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *The Journal of cell biology* 158, 1005-1015.
- Nédélec, F. (2002). Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *The Journal of cell biology* 158, 1005-1015.
- Neumann, F.R., and Nurse, P. (2007). Nuclear size control in fission yeast. *J Cell Biol* 179, 593-600.
- Novak, M., Polak, B., Simunic, J., Boban, Z., Kuzmic, B., Thomae, A., Tolic, I.M., and Pavin, N. (2017). The mitotic spindle is chiral due to torques generated by motor proteins. *bioRxiv*, 167437.
- Øksendal, B. (2003). Stochastic differential equations. In *Stochastic differential equations* (Springer), pp. 65-84.
- Pavin, N., and Tolic, I.M. (2016). Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annu Rev Biophys* 45, 279-298.
- Pavin, N., and Tolic-Norrelykke, I.M. (2014). Swinging a sword: how microtubules search for their targets. *Syst Synth Biol* 8, 179-186.
- Petry, S., Groen, A.C., Ishihara, K., Mitchison, T.J., and Vale, R.D. (2013). Branching microtubule nucleation in *Xenopus* egg extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell* 152, 768-777.
- Polak, B., Risteski, P., Lesjak, S., and Tolic, I.M. (2017). PRC1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase. *EMBO Rep* 18, 217-230.
- Prelogović, M., Winters, L., Milas, A., Tolić, I.M., and Pavin, N. (2019). Pivot-and-bond model explains microtubule bundle formation. *Phys Rev E* 100, 012403.
- Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 187-201.

- Reber, S.B., Baumgart, J., Widlund, P.O., Pozniakovsky, A., Howard, J., Hyman, A.A., and Julicher, F. (2013). XMAP215 activity sets spindle length by controlling the total mass of spindle microtubules. *Nat Cell Biol* 15, 1116-1122.
- Roostalu, J., Hentrich, C., Bieling, P., Telley, I.A., Schiebel, E., and Surrey, T. (2011). Directional switching of the kinesin Cin8 through motor coupling. *Science* 332, 94-99.
- Saunders, W., Lengyel, V., and Hoyt, M.A. (1997). Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Mol Biol Cell* 8, 1025-1033.
- Schnitzer, M.J., Visscher, K., and Block, S.M. (2000). Force production by single kinesin motors. *Nat Cell Biol* 2, 718-723.
- Sharp, D.J., Yu, K.R., Sisson, J.C., Sullivan, W., and Scholey, J.M. (1999). Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol* 1, 51-54.
- Shimamoto, Y., Forth, S., and Kapoor, T.M. (2015). Measuring Pushing and Braking Forces Generated by Ensembles of Kinesin-5 Crosslinking Two Microtubules. *Dev Cell* 34, 669-681.
- Sozanski, K., Ruhnnow, F., Wisniewska, A., Tabaka, M., Diez, S., and Holyst, R. (2015). Small Crowders Slow Down Kinesin-1 Stepping by Hindering Motor Domain Diffusion. *Phys Rev Lett* 115, 218102.
- Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E.M., Arthur, C.P., Bick, M.J., Campbell, E.A., Darst, S.A., Milligan, R.A., and Kapoor, T.M. (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142, 433-443.
- Svoboda, K., and Block, S.M. (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* 77, 773-784.
- Taylor, E.W., and Borisy, G.G. (2000). Kinesin processivity. *J Cell Biol* 151, F27-29.
- Tirado, M.M., and de la Torre, J.G. (1979). Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. *The Journal of Chemical Physics* 71, 2581-2587.
- Tirado, M.M., and de la Torre, J.G. (1980). Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. *The Journal of Chemical Physics* 73, 1986-1993.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
- Valentine, M.T., Fordyce, P.M., Krzysiak, T.C., Gilbert, S.P., and Block, S.M. (2006). Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5

- step processively and support substantial loads in vitro. *Nat Cell Biol* 8, 470-476.
- Valentine, M.T., and Gilbert, S.P. (2007). To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5. *Curr Opin Cell Biol* 19, 75-81.
- Van Kampen, N. (1981). Itô versus stratonovich. *Journal of Statistical Physics* 24, 175-187.
- Van Kampen, N.G. (1992). *Stochastic processes in physics and chemistry*, Vol 1 (Elsevier).
- Vukusic, K., Buda, R., Bosilj, A., Milas, A., Pavin, N., and Tolic, I.M. (2017). Microtubule Sliding within the Bridging Fiber Pushes Kinetochore Fibers Apart to Segregate Chromosomes. *Developmental cell* 43, 11-23 e16.
- Ward, J.J., Roque, H., Antony, C., and Nedelec, F. (2014). Mechanical design principles of a mitotic spindle. *Elife* 3, e03398.
- White, M.J.D. (1977). *Animal cytology and evolution* (CUP Archive).
- Winey, M., Mamay, C.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., Giddings, T.H., Jr., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1995). Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. *J Cell Biol* 129, 1601-1615.
- Winters, L., Ban, I., Prelogovic, M., Kalinina, I., Pavin, N., and Tolic, I.M. (2019). Pivoting of microtubules driven by minus-end-directed motors leads to spindle assembly, *BMC Biol* 17, 42.
- Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2008). Reverse engineering of force integration during mitosis in the *Drosophila* embryo. *Mol Syst Biol* 4, 195.
- Yamashita, A., Sato, M., Fujita, A., Yamamoto, M., and Toda, T. (2005). The roles of fission yeast *ase1* in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Mol Biol Cell* 16, 1378-1395.
- Yamashita, N., Morita, M., Legant, W.R., Chen, B.C., Betzig, E., Yokota, H., and Mimori-Kiyosue, Y. (2015). Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus. *J Biomed Opt* 20, 101206.
- Ziebert, F., Vershinin, M., Gross, S.P., and Aranson, I.S. (2009). Collective alignment of polar filaments by molecular motors. *Eur Phys J E Soft Matter* 28, 401-409.

5 Životopis i popis radova

Marcel Prelogović rođen je 16.4.1985. u Zagrebu. Diplomirao je 2013. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sveučilišta u Zagrebu s temom “Mjerna nesigurnost TL dozimetrijskog sustava za osobnu dozimetriju” pod Mentorstvom izv.prof.dr.sc. Dinka Babića. Od 2013. godine zaposlen je kao asistent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sveučilišta u Zagrebu, odjelu za fiziku u grupi izv.prof.dr.sc. Nenada Pavina, u sklopu čega i radi doktorat. Radio je na projektima HKF, DFG, HRZZ, a trenutno radi na projektu “Provedba vrhunskih istraživanja u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih algebri“. Kao asistent, držao je vježbe iz kolegija Fizika za studente Biološkog odsjeka PMF-a, vježbe iz kolegija Fizika 1 za studente Matematičkog odsjeka PMF-a, te kolegija Kvantna Fizika za studente profestorskog smjera Fizičkog odsjeka PMF-a. Aktivno je sudjelovao (usmenom ili posterskom prezentacijom) na 11 međunarodnih i 2 domaća znanstvena skupa. U sklopu znanstvenog rada napisao je dva članka na kojima je prvi ili dijeljeni prvi autor, koji su objavljeni u CC znanstvenim časopisima:

L. Winters, I. Ban, M. Prelogović, I. Kalinina, N. Pavin, and I. M. Tolic, *Pivoting of microtubules driven by minus-end-directed motors leads to spindle assembly*, BMC Biol 17, 42 (2019).

M. Prelogović, L. Winters, A. Milas, I. M. Tolic, and N. Pavin, *Pivot-and-bond model explains microtubule bundle formation*, Phys Rev E 100, 012403 (2019).